

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
Lehrstuhl für Pharmakologie
Vorstand: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

vorgelegt über das

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
im Fachbereich Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. D. Hegner

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER INSULINSEKRETION:

**Bedeutung von Thiol-Gruppen in der β -Zelle der Langerhans'schen
Insel für die Freisetzung von Insulin und ihre mögliche Bedeutung zum
Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Muhammad Shoaib Akhtar

aus

Lyallpur (Pakistan)

München 1977

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
Lehrstuhl für Pharmakologie
Vorstand: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

vorgelegt über das

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
im Fachbereich Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. D. Hegner

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER INSULINSEKRETION:

Bedeutung von Thiol-Gruppen in der β -Zelle der Langerhans'schen
Insel für die Freisetzung von Insulin und ihre mögliche Bedeutung zum
Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Muhammad Shoaib Akhtar

aus

Lyallpur (Pakistan)

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. D. Hegner

auswärtiger

Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon / Tübingen

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes.

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)
2. Aufl. (1944/45)

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)

1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)



1944/45: 1. Auflage, 1. Aufl. (1. Aufl. 1944/45)
2. Aufl. (1944/45)

Abkürzungen

6-AN	6-Aminonicotinamidsäure
ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	t-Butylhydroperoxid
p-CMB	p-Chlormercuribenzoat
E	Einheiten
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
Fr-1,6-P ₂	Fructose-1,6-diphosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Gl-DH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung
MB	Methylenblau
μE	Mikroeinheiten
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
6-PG	6-Phosphogluconat
6-PG-DH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
pMol	Picomol
PPS	Pentosephosphat shunt
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1. Stand der Forschung	1
1.2. Fragestellung	8
2. <u>METHODIK</u>	9
2.1. Versuchstiere	9
2.2. Material	9
2.2.1. Chemikalien und Enzyme	9
2.2.2. Nährlösungen	10
2.2.2.1. Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung	10
2.2.2.2. Hank's Lösung	12
2.3. Experimenteller Teil	12
2.3.1. Isoliertes perfundiertes Rattenpankreas	12
2.3.1.1. Operation	12
2.3.1.2. Perfusionslösungen	16
2.3.1.3. Perfusionsprotokoll	18
2.3.1.4. Perfusionsappatur	19
2.3.1.5. Durchführung der Perfusion	19
2.3.1.6. Untersuchungen mit p-CMB	23
2.3.1.7. Untersuchungen mit Leucin	24
2.3.1.8. Untersuchungen mit exogenem Insulin	24
2.3.1.9. Insulin-Bestimmung	25

2.3.2.	Isolierte Langerhans'sche Inseln	26
2.3.2.1.	Operation	27
2.3.2.2.	Isolierung der Langerhans'schen Inseln	27
2.3.2.3.	Herstellung von KRB-Lösung für die Inkubation der Inseln	28
2.3.2.4.	Vorinkubation der Langerhans'schen Inseln	30
2.3.2.5.	Hauptinkubation	30
2.3.2.6.	Bestimmung von Glucose-6-Phosphat	31
2.3.2.7.	Bestimmung von 6-Phosphogluconat (6-PG)	35
2.3.2.8.	Anpassung der Methodik an die früheren Unter- suchungen von Ammon und Verspohl (46)	37
2.3.3.	Darstellung der Ergebnisse	37
2.3.4.	Versuchsauswertung	38
3.	<u>VERSUCHSERGEBNISSE</u>	39
3.1.	Isoliert-perfundiertes Rattenpankreas	39
3.1.1.	Parachlormercuribenzoat(p-CMB)-induzierte Insulinsekretion	39
3.1.1.1.	Einfluss von Methylenblau	39
3.1.1.2.	Einfluss von Diamid	42
3.1.1.3.	Einfluss von t-Butylhydroperoxid (t-BHP)	46
3.1.1.4.	Einfluss von exogenem Insulin	46
3.2.1.	Leucin-induzierte Insulinsekretion	52
3.2.2.	Einfluss von t-BHP	57
3.3.	Isolierte Pankreasinseln	57
3.3.1.	Glucose-6-Phosphat (G-6-P)	57

3.3.2.	6-Phosphogluconat (6-PG)	57
3.3.3.	6-Phosphogluconat/Glucose-6-Phosphat (6-PG/G-6-P)-Quotient	62
4.	<u>DISKUSSION</u>	66
4.1.	Bedeutung von SH-Gruppen für die Insulin- sekretion der β -Zelle	66
4.2.	PPS und Feedback-Hemmung der Insulinsekretion	72
4.3.	SH-Gruppen und Feedback-Hemmung der Insulin- sekretion	76
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	79
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	82

1. E I N L E I T U N G

1.1. Stand der Forschung

Der Mechanismus, über den Glucose die β -Zelle zur Freisetzung von präformiertem Insulin veranlaßt, ist bis heute noch weitgehend ungeklärt. Es gibt im wesentlichen zwei Hypothesen:

1. Das Glucosemolekül führt als solches über einen postulierten Rezeptor zur Stimulierung der Insulinsekretion (1 - 6).
2. Nicht das Glucosemolekül, sondern ein bei seinem Metabolismus über den Embden-Meyerhoff-Weg entstehendes Zwischenprodukt stellt den Initiator zur Freisetzung von Insulin dar (7 - 9).

Darüber-hinaus liefert Glucose bei seinem Abbau wichtige Cofaktoren wie beispielsweise ATP und NADPH usw. (10).

Die 1. Hypothese gründet sich vor allem auf folgende Beobachtungen:

- a) Glucose stimuliert die Sekretion von Insulin aus der β -Zelle in Abhängigkeit von seiner Konzentration (11, 12).
- b) Galactose und andere Zucker, die nur langsam oder gar nicht metabolisiert werden, stimulieren ebenfalls die Insulinsekretion (6).
- c) Während es nach Zufuhr von Glucose zu einer sofortigen Insulinsekretion kommt, findet sich in der β -Zelle erst später ein Anstieg von Glucosemetaboliten wie: G-6-P, 6-PG, Fr-1,6-P₂ und 3-P-Glycerat (6).

- d) Die in vitro- und in vivo-Stimulierung der Insulinsekretion durch so verschiedene Stoffe wie Monosaccharide (Glucose, Mannose und Galactose), Zuckeralkohole (Xylitol und Sorbitol) und Zuckerderivate (Glucosamin, 3-O-Methylglucose, 2-Deoxyglucose) kann nur dadurch erklärt werden, daß ihnen ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus unter Beteiligung eines Glucoserezeptors mit breiter Spezifität zugrunde liegt (6).
- e) Phlorrhizin und Phloretin stimulieren die Insulinsekretion sogar in Abwesenheit von Glucose und dieser Effekt wird durch Mannoheptulose aufgehoben (4, 5).
- f) Mannoheptulose hemmt die Glucose-induzierte Insulinsekretion sofort, die Glucosemetabolisierung jedoch erst später (nach 15 Min.) (13, 14).
- g) Eine Totalhemmung der Glycolyse durch Jodacetat in vitro hat keinen Einfluss auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion, wenn gleichzeitig durch Zusatz von Pyruvat die Energieversorgung der β -Zelle gesichert ist. Umgekehrt hemmen niedrige Konzentrationen von Jodacetamid die Ansprechbarkeit der β -Zelle gegenüber Glucose, ohne dabei die Glycolyse (Lactatbildung) zu beeinflussen (15, 16).

Matschinsky und Mitarbeiter (15) haben die Funktion der Glucose in die eines Initiators der Insulinsekretion und die eines Energielieferanten getrennt und zwar aufgrund folgender Befunde: Jodacetat und Natriumfluorid blockieren z.B. die Glycolyse ohne gleichzeitig die Glucose-induzierte Insulinsekretion zu hemmen . Umgekehrt steigern verschiedene Hexosen (Galactose, 3-O-Methylglucose) die Glycolyse ohne jedoch die Insulinsekretion zu stimulieren (15).

Alle hier aufgeführten Befunde stellen allerdings nur indirekte Hinweise für die Rezeptortheorie dar; eine Glucoserezeptorstruktur wurde bisher nicht sichtbar gemacht.

Für die Hypothese anderer Autoren, nach der irgendein Metabolit der Glucose den Initiator für die Insulinfreisetzung darstellt, werden folgende Argumente vorgebracht:

- a) Die Glucose-induzierte Insulinsekretion korreliert mit dem Stoffwechsel der Glucose in der Langerhans'schen Insel (17 - 20).
- b) Viele Zucker, die im Pentosephosphatstoffwechsel (PPS) und in der Glycolyse in Metaboliten der Glucose umgewandelt werden, können eine Insulinsekretion hervorrufen (11, 17 - 19).
- c) Metaboliten der Glucose, wie z.B. D-Glycerinaldehyd (18, 21) und 1,3-Dihydroxyaceton (21) lösen selbst eine Insulinfreisetzung aus; wahrscheinlich treten sie nach Phosphorylierung in der β -Zelle als Triose-Phosphat in die Glycolyse ein.

Es gibt also sowohl für die Rezeptortheorie als auch für die Metabolittheorie gute Gründe. Weniger Aufmerksamkeit ist bis dato der Rolle des Glucoseabbaus über den PPS geschenkt worden. Bei mehreren endokrinen Geweben, z.B. Hypophyse, Schilddrüse und Nebennierenrinde wurde auf die Bedeutung dieses Abbauweges der Glucose für deren Funktion bereits hingewiesen (22). Eine Bedeutung scheint diesem Stoffwechsel aber auch für die Funktion der Langerhans'schen Insel zuzukommen. So wurde in den Inseln von Fisch, Mensch und Ratte als indirektes Maß für die Aktivität des

PPS ein hohes Verhältnis von ^{14}C -1- zu ^{14}C -6 Glucoseoxidation (gemessen als $^{14}\text{CO}_2$) gefunden (23, 24, 25). In den Inseln von Mäusen ließen sich die Enzyme des PPS nachweisen (26). Von einigen japanischen Arbeitsgruppen wurde darüber-hinaus gezeigt, daß Xylitol, ein mehrwertiger Alkohol, der über den PPS abgebaut wird, bei Hunden die Insulinsekretion stimuliert (27, 28), und später beobachteten Montague und Taylor (29), daß auch verschiedene Ribosen, die ebenfalls nur über den PPS metabolisiert werden, zur Sekretion von Insulin zu führen vermögen.

Kürzlich wurde dem PPS auch von Heinze und Steinke (30) eine Rolle bei der Insulinsekretion zugeschrieben. Sie fanden nämlich, daß Inseln foetaler Ratten zwar Glucose über die Glycolyse, nicht aber über den PPS abbauten. Diese Inseln waren darüber-hinaus nicht in der Lage, auf einen Glucosereiz mit einer Insulinsekretion zu antworten. Erst zwei Tage nach der Geburt stieg die Glucoseoxidation via PPS signifikant an und damit setzte auch die Glucose-induzierbare Insulinsekretion ein. Gerade letztere Befunde warfen die Frage auf, ob der Glucoseabbau im PPS möglicherweise eine Voraussetzung für die Sekretion von Insulin ist. Von Ammon und Steinke (31, 32) wurden daher weitere Untersuchungen zur Frage nach einer möglichen Bedeutung des PPS bei der Insulinsekretion angestellt. Sie fanden dabei, daß eine Hemmung des PPS in Langerhans'schen Inseln, hervorgerufen durch 6-Aminonicotinamid (6-AN), einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese (vorwiegend des NADP) (33), mit einer Hemmung der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergeht.

Da bekannt war, daß 6-AN in verschiedenen Geweben, einschließlich der Langerhans'schen Inseln, zu einer Abnahme von NADPH führt (34, 35), welches seinerseits im Zusammenhang mit dem Redoxzustand des Glutathions (36) steht, wurde von diesen Autoren die Hypothese aufgestellt, daß die Funktion des PPS bei der Insulinsekretion möglicherweise in der Bildung von NADPH besteht, welches dann wiederum die Aufgabe hat, Glutathion in reduziertem Zustand zu halten (31). Zur Frage, ob und in welcher Weise auch dem reduzierten Glutathion eine wichtige Rolle im Mechanismus der Insulinfreisetzung zukommt, wurden bisher allerdings keine Untersuchungen angestellt.

Der Beantwortung dieser Frage kann dadurch nähergekommen werden, daß man mit Hilfe von metabolischen Hemmstoffen die Konzentration von NADPH und GSH senkt und nun untersucht, ob unter dieser Bedingung eine Stimulierung der Insulinsekretion möglich ist. Allerdings gibt ein solches Vorgehen noch keine Auskunft darüber, an welcher Stelle des Sekretionsmechanismus reduziertes Glutathion einzuordnen ist.

Bloom et al. (37) und Hellman et al. (38) haben kürzlich berichtet, daß Thiol-Reagenzien, wie z.B. p-CMB, die nur sehr langsam in die Zelle eintreten, sehr rasch die Insulinsekretion stimulieren, indem sie vermutlich mit oberflächlichen Thiol-Gruppen in/auf der Membran der β -Zelle reagieren (39,40). Da die Möglichkeit bestand, daß diese Thiol-Gruppen durch den Redox-Zustand des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten moduliert werden, der seinerseits sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem NADPH/NADP-Quotienten und der Aktivität des PPS

in der β -Zelle steht, war es jetzt von Interesse zu untersuchen, ob durch Substanzen, die den NADPH/NADP-Quotienten bzw. den GSH-Spiegel in der Langerhans'schen Insel erniedrigen, auch die Insulin-freisetzende Wirkung des Thiol-Reagenz, p-CMB gehemmt werden kann. Dies ist, wie in dieser Arbeit gezeigt werden wird, tatsächlich der Fall. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, daß für die Aufrechterhaltung der zur Erkennung eines Initiators der Insulinsekretion notwendigen SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle die Bildung von reduziertem Glutathion via PPS $\longrightarrow$ NADPH erforderlich ist.

Wenn man von dieser Hypothese ausgeht, dann erhebt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz, das heißt die Frage, ob die unter bestimmten physiologischen Bedingungen erfolgende Stimulation oder Hemmung der Insulinsekretion im Zusammenhang mit entsprechender Änderung des PPS - NADPH - GSH steht und ob möglicherweise die sekretorische Antwort der β -Zelle auf einen gegebenen Initiator durch Regulation der Aktivität des PPS beeinflußt werden könnte.

Auf die mögliche Beziehung zwischen PPS und Insulinsekretion bei Inseln foetaler Ratten wurde bereits hingewiesen (30). Untersuchungen von Frerichs et al. (41), Iversen und Miles (42) und Rappaport et al. (43) haben gezeigt, daß die Glucose-induzierte Insulinsekretion durch exogenes Insulin gehemmt wird. Ferner wurde gefunden, daß diese Hemmung mit einer Verminderung der Aktivität des PPS (44) und mit einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten (45) einhergeht. Weiterhin postulieren Ammon und Verspohl (46) daß die Feedback-Hemmung der Insulinfreisetzung wenigstens teilweise auf die Hemmung des PPS

und die Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten durch exogenes Insulin zurückzuführen sein dürfte. Dies würde bedeuten, daß Insulin direkt oder indirekt hemmend auf die Regulierung des PPS einwirkt und dadurch möglicherweise über eine Abnahme von NADPH und GSH (?) die Ansprechbarkeit der β -Zelle gegenüber einem Initiator vermindert.

Die Aktivität des PPS in der Leber wird nach Gumma et al. (47) und Eggleston und Krebs (48) an dessen Initialschritt, nämlich der Umsetzung von G-6-P zu 6-PG durch das Enzym G-6-P-DH kontrolliert. Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob exogenes Insulin bei der Pankreasinsel die Aktivität des PPS an diesem Schlüsselenzym hemmt. Dies war in der Tat, wie noch gezeigt werden wird, der Fall.

Wenn man nun unterstellt, daß die für die Erkennung des Initiators in der Membran der β -Zelle erforderlichen freien SH-Gruppen von der Aktivität des PPS abhängen, dann sollte durch exogenes Insulin nicht nur die Insulin-freisetzende Wirkung von Glucose, sondern auch die durch p-CMB stimulierbare Insulinsekretion, die ja vom Vorhandensein freier SH-Gruppen in der Membran abhängt, gehemmt werden. Auch dieses konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Es ist daher möglich, daß exogenes Insulin via Hemmung des PPS an der G-6-P-DH - zur Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten- zur Abnahme von GSH - und zur Abnahme von SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle führt, und daß dadurch die Ansprechbarkeit der β -Zelle und damit auch ihre sekretorische Antwort gegenüber solchen Initiatoren der Insulinsekretion gehemmt wird, für deren Wirkung das Vorhandensein freier SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle Voraussetzung ist.

1.2. Fragestellung

Im einzelnen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a) Wird durch p-CMB am perfundierten Rattenpankreas eine Insulinsekretion ausgelöst?
- b) Ist diese Sekretion durch MB, einem Oxidationsmittel von NADPH, zu blockieren?
- c) Wird die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB durch Diamid, einem Oxidationsmittel von GSH und t-BHP, einem Substrat der Glutathionperoxidase, das ebenfalls zur Abnahme von GSH führt, gehemmt?
- d) Sind die möglichen Hemmungseffekte von MB, Diamid und t-BHP reversibel?
- e) Wird durch Leucin, einer Aminosäure, die den NADPH/NADP-Quotienten der Langerhans'schen Inseln erhöht (49), die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB verstärkt?
- f) Ist der 6-PG/G-6-P-Quotient der Langerhans'schen Inseln, als Maß für die Aktivität der G-6-P-DH, von der Glucosekonzentration abhängig?
- g) Wird dieser Quotient von der Konzentration des Insulins im Medium kontrolliert, bzw. vermindert exogenes Insulin möglicherweise die Aktivität der G-6-P-DH?
- h) Läßt sich eine mögliche Senkung dieses Quotienten mit der von anderen (46) beobachteten Hemmung des PPS, Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten sowie der Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion korrelieren?
- i) Kann durch exogenes Insulin auch die durch p-CMB induzierbare Insulinsekretion gehemmt werden?

2. M E T H O D I K

Für die folgenden Untersuchungen wurde sowohl die Technik des isoliert-perfundierten Pankreas verwendet, die sich besonders gut zum Studium der Dynamik der Insulinsekretion eignet und den Verhältnissen in vivo relativ nahek kommt, als auch das Modell der isolierten Langerhans'schen Inseln. An letzterem lassen sich besonders Stoffwechseluntersuchungen durchführen, da das Gewebe nach in vitro-Behandlungen sofort biochemischen Untersuchungsmethoden zugänglich ist.

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet, mit einem Gewicht zwischen 250 und 350 g. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum. Sie waren in einem temperatur- und lichtkontrollierten Raum bei 24⁰ C gehalten worden.

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien und Enzyme

Adenosin-triphosphat

Boehringer, Mannheim

t-Butylhydroperoxid

Merck-Schuchardt, München

p-Chlormercuribenzoat (Na-Salz)

Merck-Schuchardt, München

Collagenase (196 E/mg)

Worthington Biochem. Corp.

Freehold, U.S.A.

Dextran (MG 60.000 - 90.000)	Serva, Heidelberg
Diamid (synthetisiert von Dr. Vitzthum)	HAG AG, Bremen
α -D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glucose-6-phosphat	Boehringer, Mannheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Glutamat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
INSIK-1 ^(R) (Insulin Radioimmunoassay Kit)	Isotopen Dienst West, Sprendlingen
α -Ketoglutarsäure	Boehringer, Mannheim
Methylenblau	Fluka, Buchs
NADP	Boehringer, Mannheim
NADPH	Boehringer, Mannheim
6-Phosphogluconat	Boehringer, Mannheim
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Ratteninsulin	Novo Lab. Copenhagen
Rinder-Serumalbumin	Behringwerke, Marburg
Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan	Boehringer, Mannheim

Alle nicht genannten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt und waren "p.a.".

2.2.2. Nährlösungen

2.2.2.1. Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung

Es wurde verwendet die KRB-Lösung nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al. (50) mit folgender Zusammensetzung:

NaCl-Lösung	: 0,90 %	=	(0,154 M)	100 Teile
KCl-Lösung	: 1,15 %	=	(0,154 M)	4 Teile
CaCl ₂ -Lösung	: 1,22 %	=	(0,11 M)	3 Teile
KH ₂ PO ₄ -Lösung	: 2,11 %	=	(0,154 M)	1 Teil
MgSO ₄ ·7H ₂ O-Lösung	: 3,82 %	=	(0,154 M)	1 Teil
NaHCO ₃ -Lösung	: 1,30 %	=	(0,154 M)	21 Teile

Um diese Lösung über längere Zeit aufbewahren zu können, hat es sich als praktisch erwiesen, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

<u>Lösung "A"</u>	(Stammlösung ohne NaHCO ₃ u. CaCl ₂)	:
	NaCl	69,2 g
	KCl	3,61 g
	KH ₂ PO ₄	1,62 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,93 g
	gelöst in 1 Liter Aqua dest.	

<u>Lösung "B"</u>	(NaHCO ₃ -Lösung)	
	NaHCO ₃	21,10 g
	gelöst in 1 Liter Aqua dest.	

<u>Lösung "C"</u>	(CaCl ₂ -Lösung)	
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,73 g
	gelöst in 1 Liter Aqua dest.	

Diese Lösungen wurden getrennt voneinander bei +4° C aufbewahrt und vor Gebrauch wie auf den Seiten 16 und 28 angegeben, gemischt.

2.2.2.2. Hank's Lösung

Stammlösung

NaCl	80	g
KCl	4	g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,76	g
KH_2PO_4	0,60	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,85	g
Aqua dest. ad 1000 ml		

Vor Gebrauch wird diese Stammlösung 1 + 9 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH-Wert mit NaHCO_3 -Lösung auf 7,35 eingestellt.

2.3. Experimenteller Teil

2.3.1. Isoliertes perfundiertes Rattenpankreas
modifiziert nach Curry et al. (51)

2.3.1.1. Operation:

300 - 350 g schwere Ratten wurden mit Hexobarbital-Natrium (14 mg/100 g) intraperitoneal narkotisiert. Die folgenden Operationsschritte, von denen einige in Abb. I dargestellt sind, wurden durchgeführt, um das Pankreas zu isolieren samt Milz, Magen und Duodenum (Abb. II-a):

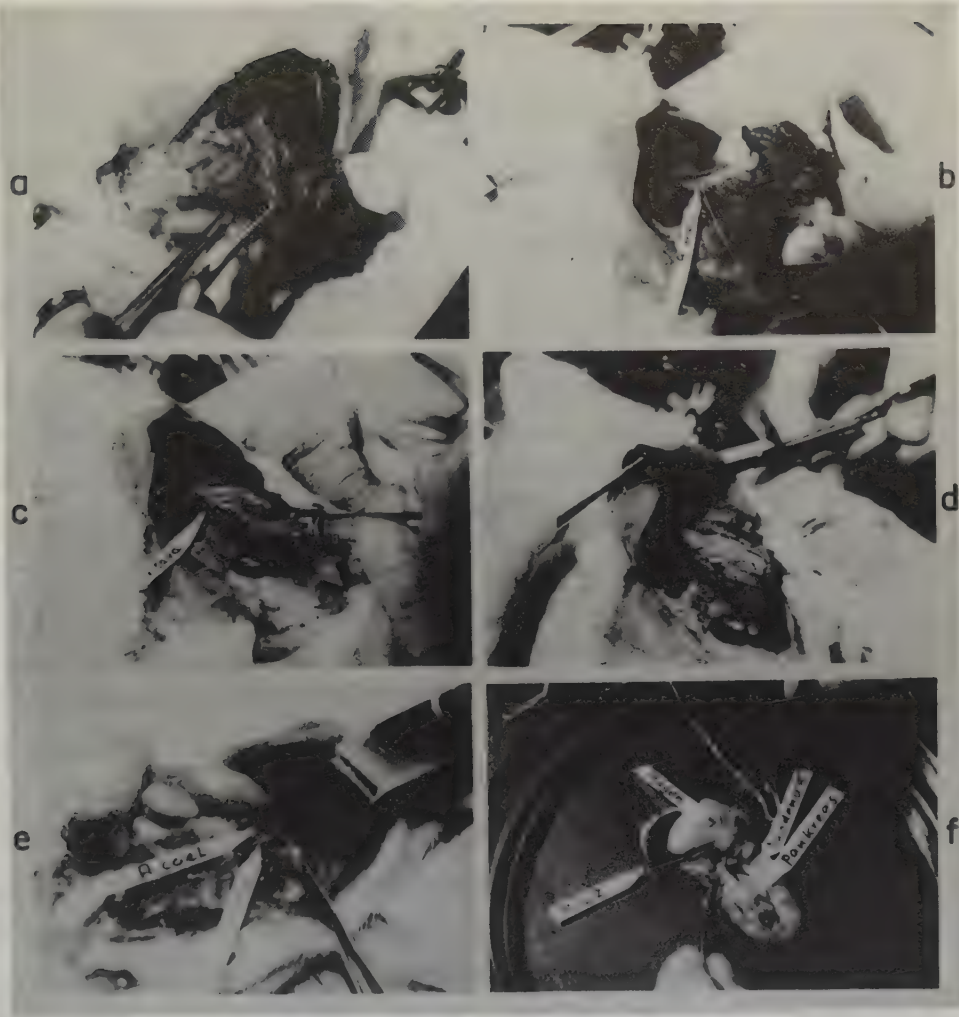


Abb. I: Isolierung des Pankreas:

- a) Durchtrennung des Bindegewebes zwischen Duodenum u. Rectum
- b) Sichtbarmachung der Arteria mesenterica
- c) Injektion von Heparin in die Vena cava
- d) Durchtrennung sämtlicher Bänder zwischen Leber und Magen
- e) Abklemmung der Aorta oberhalb der Arteria coeliaca
- f) Isoliertes Präparat: Magen, Milz, Duodenum u. Pankreas.
Dieser Gewebesblock wird als Gesamtes an die Perfusions-
apparatur angeschlossen

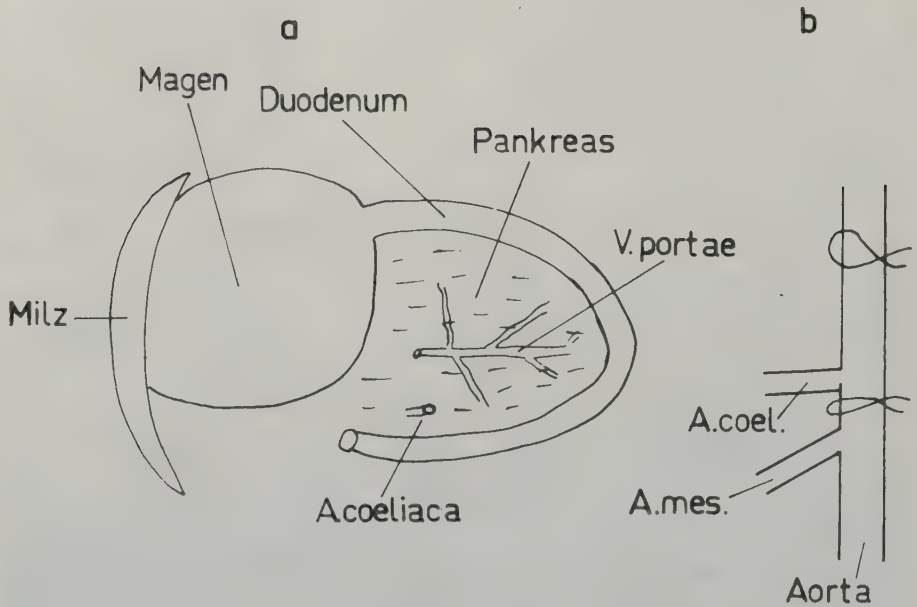


Abb. II: a) Schematische Darstellung des isolierten Pankreas (einschließlich Milz, Magen und Duodenum mit Lage der Arteria coeliaca und Vena portae
b) Abgänge der Arteria coeliaca sowie der Arteria mesenterica von der Aorta

Durch einen Medianschnitt bis zum Brustbein wurde das Abdomen eröffnet und der gesamte Darm nach rechts gelegt. Nach Durchtrennen des Bindegewebes zwischen Duodenum und Rectum wird die Arteria mesenterica sichtbar. Diese wird kurz nach der Abzweigung von der Aorta zweimal abgebunden und durchtrennt.

Das Rectum wird in der Nähe des Anus abgebunden und über dieser Stelle abgetrennt. Nun werden die Därme nach links gelegt, das Rectum ab dem Darmstumpf bis zum Beginn des Colons der Länge nach geöffnet und eventuell vorhandener Kot entfernt. Danach werden sämtliche Därme wieder nach rechts gelegt und einerseits zwischen dem Beginn des Colons und dem Ende des Rectums und andererseits zwischen dem Ileum und dem Duodenum durchschnitten.

Um Thrombenbildung zu vermeiden, werden in die Vena cava inferior 0,5 ml Heparin (5000 I.E. pro ml) injiziert. Nachdem sämtliche Leberbänder zwischen Magen und Leber durchtrennt sind, wird der Oesophagus sichtbar. Dieser wird ebenfalls abgebunden und durchschnitten. Das Bindegewebe zwischen Magen und Bauchinnenraum läßt sich durchtrennen, indem man den Magen hochhält. Jetzt können Magen, Milz und Duodenum samt Pankreas vorsichtig mit feuchten Tupfern nach links gelegt werden. Danach wird die Leber mit einem Haken hochgezogen. Um die Aorta freizupräparieren, wird das Bindegewebe in Höhe der Nierengefäße, unterhalb der Arteria mesenterica und oberhalb der Arteria coeliaca beseitigt.

Anschließend wird oberhalb der Arteria coeliaca an die Aorta eine Klemme angelegt. Der Leberhaken wird entfernt. Um die zu isolierenden Organe vom gesamten Blutkreislauf abzutrennen, wird zunächst einerseits die Vena hepatica portalis abgebunden und möglichst nahe der Leber durchtrennt und andererseits die Aorta zwischen Arteria mesenterica und Arteria coelica sowie unterhalb der Klemme durchschnitten (Abb. II-b). Der Aortenstumpf wird längsseits geöffnet, hochgehalten und das gesamte Präparat freipräpariert.

In einer Petrischale wird das Präparat in eine Stellung gebracht, die es bei der anschließenden Perfusion einnehmen sollte (siehe Abb. I). Der Magen wird geöffnet, der Mageninhalt ausgepreßt und mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Dann wird das isolierte Pankreaspräparat in die Vertiefung des Glasgefäßes gelegt und zuerst die Arterie und dann die Vene an die jeweilige Kanüle angeschlossen.

2.3.1.2. Perfusionslösungen:

Als Perfusionsmedium wurde ein synthetisches Medium benutzt, das KRB-Lösung als Grundlage enthielt (Zusammensetzung: siehe Punkt 2.2.2.1.). Für zwei Perfusionen, die hintereinander durchgeführt werden, wurden ca. 850 ml Perfusionsmedium benötigt. Dieses setzt sich wie folgt zusammen:

KRB-Lösung	"A"	(siehe Seite 11)	85 ml
KRB-Lösung	"B"	(siehe Seite 11)	85 ml
Aqua Dest.			595 ml

Diese Lösung wurde auf ca. 40° C erwärmt und darin zuerst 34 g Dextran (=4%) und dann 2,12 g Rinder-Serumalbumin (=0,25%) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird gemessen, mit halbkonzentrierter Salzsäure auf 7,35 eingestellt und 85 ml CaCl₂-Lösung (siehe KRB-Lösung "C") zugesetzt. Diese Lösung wurde durch Filterpapier (Nr. 595, Firma Schleicher & Schüll) abgenutscht. Von diesen 850 ml Perfusionsmedium wurden 350 ml zur "Präperfusion" verwendet und zu den restlichen 500 ml Flüssigkeit wurden folgende Stoffe zugesetzt (vgl. Perfusionsprotokoll):

1. α-D-Glucose	500 mg/500 ml	= 1 mg/ml
2. p-Chlormercuribenzoat	19 mg/500 ml	= 0,1 mM
3. Methylenblau	1 mg/500 ml	= 2 µg/ml
4. Diamid	8,6 mg/500 ml	= 0,1 mM
5. t-Butylhydroperoxid	0,1 ml/500 ml	= 2 mM
6. L-Leucin	655 mg/500 ml	= 10 mM
7. Ratteninsulin	200 mE/500 ml	= 400 µE/ml

Diese Substanzen wurden einzeln in Aqua dest. gelöst und in das Perfusionsmedium gemischt, der pH-Wert wieder auf 7,35 eingestellt.

2.3.1.3. Perfusionsprotokoll

Folgende Versuche wurden durchgeführt (siehe auch Abb. VI - XVII):

Nr.	Präperfusion	Perfusion
1	-----	Glucose (1 mg/ml)
2	-----	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml)
3	MB (2 µg/ml)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) + MB (2 µg/ml)
4	MB (2 µg/ml)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml)
5	Diamid (0,1 mM)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) + Diamid (0,1 mM)
6	Diamid (0,1 mM)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml)
7	t-BHP (2 mM)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) + t-BHP (2 mM)
8	t-BHP (2 mM)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml)
9	-----	Leucin (10 mM) + Glucose (1 mg/ml)
10	-----	Leucin (10 mM) + p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml)
11	t-BHP (2 mM)	Leucin (10 mM) + p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) + t-BHP (2 mM)
12	Exogenes Insulin (400 µE/ml)	Exogenes Insulin (400 µE/ml)
13	Exogenes Insulin (400 µE/ml)	p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) + Exogenes Insulin (400 µE/ml)
-50+30 P E R F U S I O N S Z E I T , M I N U T E N		

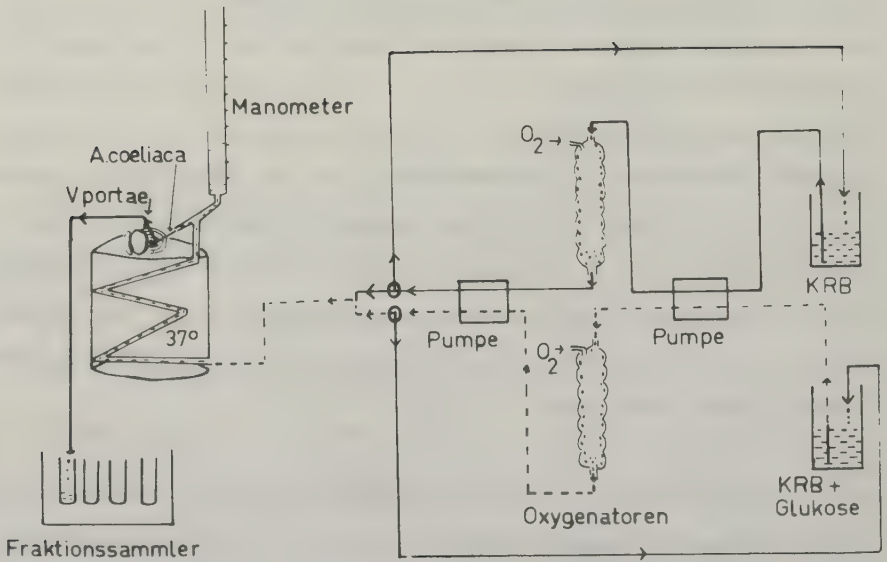
2.3.1.4. Perfusionsapparatur

Abb. III zeigt ein Schema der Perfusionsapparatur; dabei handelt es sich um ein offenes Kreissystem ohne Recycling. Das gesamte Perfusionssystem befindet sich in einer thermostatisierten Kammer. Getrennt voneinander können zwei verschiedene Perfusionslösungen angeboten werden. Aus ihren Gefäßen werden die Perfusionslösungen mit Hilfe einer Pumpe zu je einem Oxygenator geleitet, hier mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) angereichert und mit derselben Pumpe zum eigentlichen Perfusionsgerät weitertransportiert. Auf diesem Weg ist ein Dreiwegehahn eingebaut, um die jeweils gewünschte Perfusionslösung einfließen zu lassen.

Hat das Perfusionsmedium den Dreiwegehahn passiert, fließt es durch eine Spirale, die sich in einem mit Wasser temperierten Gefäß befindet. Das auf 37° C thermostatisierte Gefäß dient gleichzeitig als wärmende Unterlage für das Pankreaspräparat. Nach Austritt des Perfusionsmediums aus diesem Gefäß gelangt es zur Kanüle, an welche die Arteria coeliaca angeschlossen ist. Kurz vor dieser Kanüle ist im Seitenschluß ein offenes langes Glasrohr angeschlossen, das als Manometer dient und den Druck im Pankreaspräparat anzeigt. Der Abfluß des Perfusionsmediums erfolgt durch die Vena portae über eine weitere Kanüle, die die Verbindung zu einem Fraktionssammler herstellt. Dieser steht außerhalb der thermostatisierten Kammer.

2.3.1.5. Durchführung der Perfusion

Zuerst wurden alle Perfusionslösungen vorbereitet und die Apparatur



Isoliert perfundiertes Pankreas

Abb. III: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur
für das isolierte Pankreas

auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft. Dazu gehört, daß alle Schläuche richtig angeschlossen sind, daß sich keine Luftblasen darin befinden und daß die Zugabe an Carbogen-Gas einreguliert wird. Danach wird mit der Operation der narkotisierten Ratte begonnen und das Pankreas entnommen.

Das Pankreaspräparat wird in die Vertiefung des Glasgefäßes gelegt, die Pumpe für die Perfusionslösung wird abgestellt und zuerst die Arterie und dann die Vene an die jeweilige Kanüle angeschlossen (Abb. IV).

Jetzt wird die Pumpe mit der kleinsten Umlaufgeschwindigkeit wieder in Gang gesetzt und geprüft, ob das Perfusionsmedium aus der Vene fließt. Sollte dies **nicht** der Fall sein, wird versucht, mit einer Spritze Perfusionsmedium über die Kanüle anzusaugen bzw. das isolierte Pankreas in verschiedene Lagen zu drehen, um so den Durchfluß zu erleichtern.

Um ein Austrocknen zu vermeiden, wird das Pankreaspräparat mit feuchten Tupfern abgedeckt. Die Drehzahl der Pumpe wird soweit erhöht, daß 5 ml/min durch das Präparat fließen. Jetzt kann der Abflußschlauch an den Probenwechsler angeschlossen werden. Der eigentlichen Perfusion werden 15 Minuten zur Äquilibration vorgeschaltet. Danach folgt eine fünfminütige Präperfusion (prästimulatorische Phase), in den Abbildungen mit -5 bis 0 Minuten eingezeichnet. Während dieses Zeitraumes wird das Effluat einer Minute

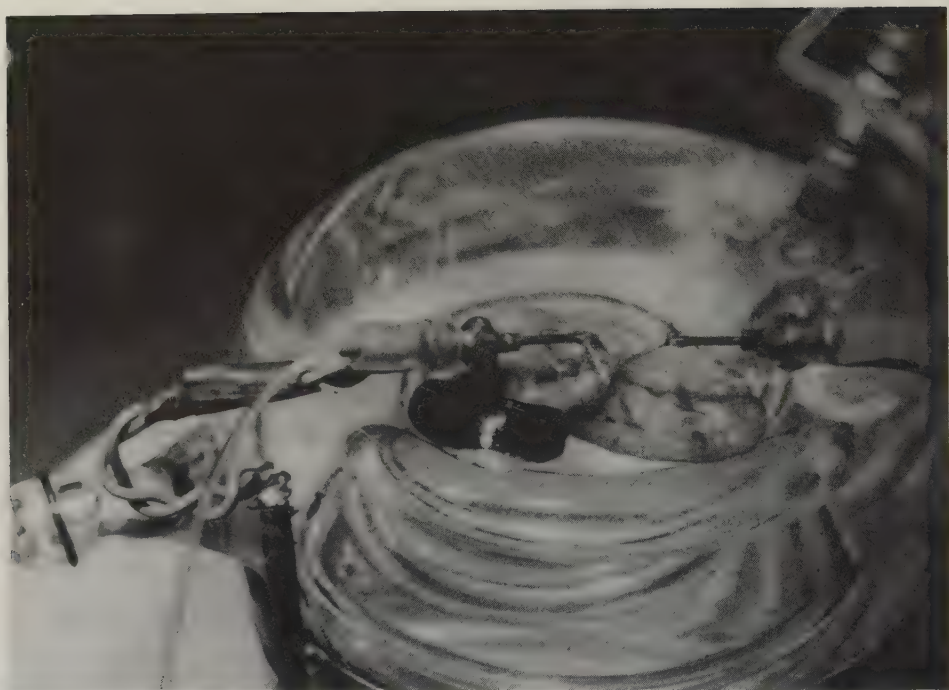


Abb. IV: Isoliertes Pankreas (einschließlich Milz, Magen und Duodenum) nach Anschluss an die Perfusionsapparatur. Rechts Arteria coeliaca; links Vena portae

in Probengläschen gesammelt. Es dient zur Bestimmung der Basalsekretion von Insulin. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wird der Dreiwegehahn umgeschaltet, so daß nun das Testmedium zufließen kann. Während der ersten 7 Minuten wird das Effluat in Abständen von 30 Sekunden gesammelt. In den folgenden 23 Minuten werden Proben nach jeweils einer Minute abgenommen. Somit stellt der Zeitraum zwischen -5 und 0 Minuten die vorstimulatorische Phase dar, und zwischen 0 und 30 Minuten die stimulatorische Phase.

2.3.1.6. Untersuchungen mit p-CMB:

Getrennt voneinander wurde einmal der stimulatorische Effekt von Glucose (1 mg/ml) allein und dann von Glucose (1 mg/ml) + p-CMB (0,1 mM) untersucht. Danach wurden die Wirkungen von MB (2 µg/ml), Diamid (0,1 mM) und t-BHP (2 mM) auf die durch Glucose (1 mg/ml) + p-CMB (0,1 mM) induzierte Insulinsekretion ermittelt. Um den NADPH-Gehalt bzw. den GSH-Gehalt durch MB bzw. Diamid und t-BHP schon vor der Stimulation der Insulinsekretion zu senken, wurden diese Substanzen bereits zur Präperfusion zugegeben. Um NADPH bzw. GSH auf einem niedrigen Niveau zu halten, wurden diese Testsubstanzen dann weiterhin zusammen mit den Stimulatoren Glucose + p-CMB in der Perfusionslösung zugeführt.

Um zu prüfen, ob MB, Diamid und t-BHP möglicherweise die β -Zelle schädigen, so daß diese bei der Stimulation nicht mehr mit einer Sekretion reagieren kann, wurden die Inhibitoren in einer weiteren Versuchsreihe dem Medium zunächst 15 Minuten lang zugesetzt. An-

schließlich wurde jedoch mit einem Medium perfundiert, das Glucose (1 mg/ml) und p-CMB (0,1 mM) enthielt, um damit eine Sekretion auszulösen, das jedoch keine Inhibitoren enthielt. Bei einer bleibenden Schädigung der β -Zelle dürfte dann p-CMB selbst bei Abwesenheit der Hemmstoffe keine Insulinsekretion induzieren.

2.3.1.7. Untersuchungen mit Leucin:

Kürzlich wurde gezeigt, daß Leucin zur Zunahme von NADPH in der Langerhans'schen Insel führt. Wenn man annimmt, daß dadurch auch der GSH-Gehalt der β -Zelle ansteigt, dann ist dies Anlaß zu prüfen, ob beim isolierten perfundierten Rattenpankreas die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB durch Leucin verstärkt wird. In Gegenwart von 1 mg/ml Glucose (siehe Perfusionsprotokoll) wurde einmal mit 10 mM Leucin und zum anderen mit 10 mM Leucin und 0,1 mM p-CMB stimuliert. Außerdem wurde geprüft, ob die durch Leucin und p-CMB erzielte Stimulation durch t-BHP (2 mM) hemmbar ist. Zu letzterem Zweck wurde nicht nur dem Hauptperfusionsmedium, sondern auch der Präperfusionslösung t-BHP (2 mM) zugegeben.

2.3.1.8. Untersuchungen mit exogenem Insulin:

In diesem Teil der Versuche am perfundierten Pankreas wurde untersucht, ob die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB durch exogenes Insulin im Sinne eines negativen Feedback hemmbar ist. Als Kontrolle

dienten Versuche, bei denen den Präperfusions- und Perfusionslösungen 400 μ E/ml Ratteninsulin zugesetzt wurde. In einer zweiten Versuchsserie wurde mit Glucose (1 mg/ml) und p-CMB (0,1 mM) stimuliert. Das Medium enthielt wie im Kontrollversuch 400 μ E/ml exogenes Insulin und zwar sowohl bei der Präperfusion als auch bei der eigentlichen Perfusion (vgl. Perfusionsprotokoll Nr. 12 & 13).

2.3.1.9. Insulin-Bestimmung:

a) Durchführung.

Die Insulinkonzentration im Effluat des perfundierten Pankreas wurde in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay (Doppel-Antikörper-Methode) gemessen (52). Die Bestimmung wurde mit dem Radioimmunoassay Kit (INSIK-I^R) durchgeführt. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Ratteninsulin verwendet. 10 μ l der Proben sowie der Standardinsulinlösungen wurden in Polystyrol Teströhrchen 1:10 mit Puffer folgender Zusammensetzung einpipettiert:

Puffer:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	550 mg
Rinderalbumin	1,0 g
Aqua dest. ad 100,0 ml, pH 7,4 eingestellt.	

Als "Leerwert" wurden 100 μ l Puffer vorgelegt. Danach wurde der

lyophilisierte Antikörperkomplex nach Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl davon den Proben zugesetzt. Die gesamten Proben wurden gut geschüttelt und 6 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank stehen gelassen. Nach diesem Zeitpunkt wurde das Jod-125-markierte Insulin nach Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl dieser Lösung auf die Proben gegeben. Dieser Ansatz wurde wiederum 18 Stunden bei 4°C im Kühlschrank stehen gelassen. Nun wurde zu allen Proben je 1 ml kalter Puffer einpipettiert (Zusammensetzung siehe oben) und diese dann 20 Minuten lang mit 3 500 U/min bei $+4^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand sofort abgekippt und die Zentrifugenröhrchen umgekehrt aufgestellt und eventuelle Tropfen, die am oberen Rand hängen, entfernt. Anschließend wurden die Proben in einem automatischen β -Zähler (Nuclear Chicago) 1 Minute lang gemessen.

b) Berechnung der Insulinwerte.

Aus den Doppelbestimmungen wird der Mittelwert der Zählrate errechnet. Danach wird der Quotient aus der ermittelten Zählrate des "Leerwertes" und der ermittelten Zählrate der Proben gebildet. Anhand einer ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve wurden die Insulinwerte der Proben mit einem Computerprogramm errechnet.

2.3.2. Isolierte Langerhans'sche Inseln nach Lacy und Kostianovsky (53)

2.3.2.1. Operation:

Die Ratten wurden jeweils mit Äther narkotisiert und das Abdomen durch einen Längsschnitt vom Becken bis zum Brustbein und je einem Querschnitt im Becken und unter den Rippenbögen eröffnet. Unter dem Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus hepaticus sichtbar zu machen, der nun zur Leber hin abgebunden wurde. Dann wurden in das Pankreas durch den Ductus hepaticus 10 ml einer eiskühlten Hank's Lösung injiziert.

Mit einer Schere wird das deutlich sichtbare Pankreas von Darm, Magen, Milz und Leber getrennt, in eine mit Hank's Lösung gefüllte Petrischale gelegt und sämtliche Fettpartikel entfernt.

2.3.2.2. Isolierung der Langerhans'schen Inseln:

Das Pankreas wurde gleichmäßig mit einer kleinen Schere so fein zerschnitten, daß man die Teilchen mit dem Konus einer 5 ml Recordspritze aufsaugen kann. Das Volumen wurde auf 5 ml mit Hank's Lösung ergänzt und der gesamte Inhalt der Spritze daraufhin in ein 20 ml Schnappdeckelglas, in welchem sich 30 mg Collagenase befanden, überführt.

In einem bei 38° C thermostatisierten Schüttelbad ließ man unter Schütteln die Collagenase solange auf das Pankreasgewebe einwirken, bis eine homogene hellbraune schleimige Flüssigkeit entstanden war (ca. 10 - 15 Minuten, je nach Aktivität der Collagenase und

Größe der Pankreaspartikel).

Anschließend wurde das Ganze in ein Becherglas gegeben, 3 mal durch den Konus der 5 ml Recordspritze gesaugt (zur weiteren mechanischen Zerkleinerung) und durch ein Plastikteesieb in einen Zylinder mit ca. 15 ml eiskalter Hank's Lösung gebracht. Auf diese Weise wurde die Collagenasereaktion abgestoppt. Wegen des unterschiedlichen Gewichtes von exokrinen Partikeln und Inseln war es möglich, beide voneinander zu trennen und zwar indem man die Inseln absetzen ließ, den Überstand absaugte und erneut mit Hank's Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde ca. 10 mal wiederholt, bis der größte Teil des exokrinen Gewebes entfernt war und die isolierten Inseln am Boden des Gefäßes mikroskopisch zu erkennen waren.

Es wurde dabei stets bei 0° C gearbeitet. Durch sorgfältiges Auslesen mit einer Mikropipette wurden die Inseln unter einem Stereomikroskop vollständig vom exokrinen Gewebe (Abb. V) getrennt und in ein Vorinkubationsmedium gebracht.

2.3.2.3. Herstellung von KRB-Lösung für die Inkubation
der Inseln (Zusammensetzung s.Seite 10- 11):

Von den Stammlösungen wurden folgende Mengen genommen und gemischt:

Aqua dest.	70 ml
Lösung "A" (s.Seite 11)	10 ml
Lösung "B" (s.Seite 11)	10 ml
Lösung "C" (s.Seite 11)	10 ml

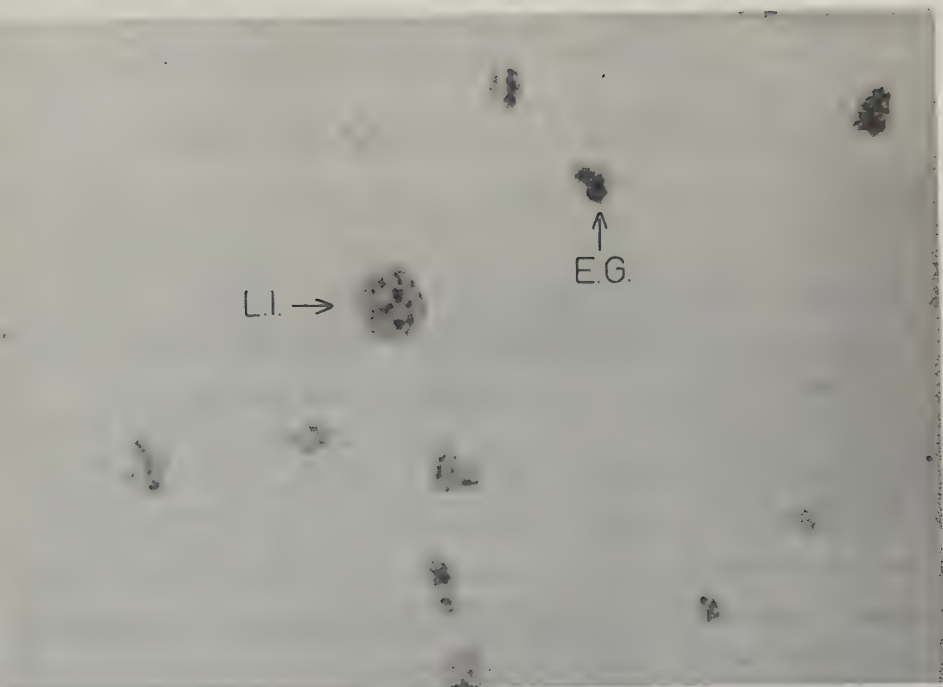


Abb. V: Lichtmikroskopisches Bild von Pankreasgewebe nach
Collagenaseverdauung.

L.I. : Langerhans'sche Insel

E.G. : Exokrines Gewebe

Anschließend wurde ca. 5 Minuten mit Carbogen begast, dann 2 % Rinderserumalbumin zugegeben und das pH auf 7,35 eingestellt.

2.3.2.4. Vorinkubation der Langerhans'schen Inseln:

Die auf oben beschriebene Weise isolierten Inseln wurden in einem 5 ml Gläschen gesammelt, das 2 - 3 ml einer Krebs-Ringer-Bicarbonat (pH 7,35)-Lösung enthielt, in der 0,3 mg/ml Glucose und 20 mg/ml Rinderserumalbumin gelöst waren. Das Gläschen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen und über eine Kanüle mit Carbogen (O_2 95 % / CO_2 5 %) begast und im Wasserbad bei $37^{\circ}C$ langsam geschüttelt. Die Vorinkubationszeit betrug 30 Minuten, sie diente der Stoffwechselregeneration nach dem Isolierungsprozess. Nach beendeter Vorinkubation wurde jeweils dreimal mit eiskalter Hank's Lösung gewaschen, um die Inseln von möglicherweise anhaftendem Insulin zu befreien.

2.3.2.5. Hauptinkubation:

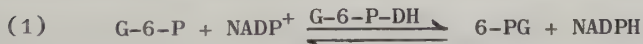
In Probegläschen von 2 ml wurden je 5 Inseln einsortiert und dazu 1 ml KRB-Lösung (pH 7,35), die Rinderserumalbumin enthält, pipettiert. Anderen Gläschen, die ebenfalls 5 Inseln enthielten, wurde ebenfalls 1 ml KRB-Lösung zugefügt. Einer ersten Serie von Proben wurden 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml Glucose zugesetzt. In einer zweiten Serie fanden sich neben 3 mg/ml Glucose

noch 200, 400 und 800 $\mu\text{E/ml}$ exogenes Insulin. Jede Serie wurde 15 oder 90 Minuten lang bei 37°C unter Begasung mit Carbogen und langsamem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Gläser sofort in eine auf $+2^{\circ}\text{C}$ gekühlte Zentrifuge gebracht und 5 Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Kälte abgesaugt, bis die Inseln vollständig trocken lagen, dann wurden sie zur Kontrolle wieder gezählt. Anschließend wurden sie der Bestimmung von G-6-P und 6-PG zugeführt.

2.3.2.6. Bestimmung von Glucose-6-Phosphat:

a) Prinzip.

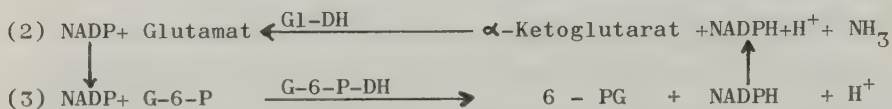
Die G-6-P-Bestimmung wurde nach dem Prinzip von Lowry et al. (54) durchgeführt. Der Bestimmung liegt folgender Reaktionsmechanismus zugrunde:



Das bei dieser Reaktion gebildete NADPH wurde durch enzymatisches Cycling gemessen (55), nachdem vorher vorhandenes NADPH mit HCl zerstört wurde.

Enzymatisches Cycling: Bei diesen Reaktionen wirken die Pyridinnucleotide als Katalysatoren einer enzymatischen Dismutation zwischen zwei Substraten. Die Nucleotid-Konzentrationen sind dabei weit unterhalb ihrer K_M -Werte; folglich sind die

Reaktionsgeschwindigkeiten proportional der Nucleotid-Konzentrationen. Nach einigen Tausend Cyclen wird eines der Produkte gemessen. Während des Cyclings läuft in unserem Fall folgender Prozeß ab:



Das unter (1) entstandene NADPH setzt sich mit α -Ketoglutarat zu NADP um (Reaktion 2). Diese wiederum geht in die Reaktion (3) ein. Dadurch entsteht ein Reaktionscyclus, in dem pro Zeiteinheit eine bestimmte Menge 6-PG gebildet wird, die der eingesetzten NADP-Konzentration proportional ist. Auf diese Weise erhält man bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten aus 1 Molekül NADP ca. 10.000 - 20.000 Moleküle 6-PG. Das gebildete 6-PG wird in einer 4. Reaktion in Ribulose-5-P und NADPH umgesetzt. Letzteres wird fluorimetrisch quantitativ gemessen.



Durch das Cycling-Verfahren ist es so möglich, mit direkten Methoden nicht meßbare Mengen an Metaboliten meßbar zu machen.

b) Durchführung

Die 5 trockengesaugten Inseln wurden in 10 μ l NaOH (40 mM) gelöst und ca. 10 Minuten stehen gelassen. Dann wurden 10 μ l

HCl (50 mM) zugegeben, um einerseits die Natronlauge zu neutralisieren und um andererseits anzusäuern. Das Gemisch wurde mit einem Mikromixer homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 15 μ l dieses Inselhomogenates in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert.

Zum Zerstören von NADP, ATP und anderen störenden Substanzen wurden die verschlossenen Gefäße 20 Minuten bei 60° C im Wasserbad erhitzt, anschließend im Eisbad abgekühlt, geöffnet und nach Zugabe von 15 μ l Reaktionsgemisch (Zusammensetzung des Reaktionsgemischs siehe Tab. I) 30 Minuten bei 25° C inkubiert. Dabei setzt sich das G-6-P mit NADP zu 6-PG und NADPH um. Nach Beendigung der Inkubation wurde jede Probe mit 25 μ l NaOH (0,3 N) versetzt und 20 Minuten bei 75° C erhitzt, um überschüssiges NADP und das Enzym des Reaktionsgemisches zu zerstören. Die Proben wurden sodann wieder abgekühlt.

Tabelle 1: Reaktionsgemisch für Bestimmungen von G-6-P & 6-PG

Metabolit	Puffer	Enzym	Andere Zusätze	Volumen des Reaktionsgemischs
G-6-P	Tris-HCl 0,15 M; pH 8,1	G-6-P-DH 1,5 μ g/ml	20 μ M NADP ⁺ u. 0,2 % Albumin	15 μ l
6-PG	Tris-HCl 0,30 M; pH 8,4	6-PG-DH 10 μ g/ml	15 μ M NADP ⁺ u. 0,2 % Albumin	6 μ l

Zur Aufstellung der Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe von G-6-P in folgenden Konzentrationen erstellt: 0,62; 1,25; 2,50; und 5 mM G-6-P in 15 μ l NaOH/HCl-Gemisch (1 Teil NaOH 40 mM + 1 Teil HCl 50 mM). Diese Proben wurden wie oben angegeben behandelt.

Zur Durchführung des enzymatischen Cycling wurden die vorher abgekühlten Proben mit 1 ml Cycling Reagenz folgender Zusammensetzung versetzt:

Zusammensetzung des Cycling Reagenz:

Tris	12,1 g (= 0,2mM)
Wasser bidest.	480 ml
gelöst und auf 8,2 pH eingestellt. Dazu	
α -Ketoglutarsäure	365 mg (= 5mM)
G-6-P	152 mg (= 1mM)
ATP	71 mg (= 0,3mM)
Ammoniumacetat	965 mg (= 25mM)

Wenn alles gelöst ist, auf 500 ml auffüllen und Portionen von 50 ml einfrieren.

Vor Gebrauch 50 ml auftauen und 0,25 ml G-6-P-DH (140 E/mg) und 0,125 ml Glutamat-DH (90 E/mg) zugeben.

Dann wurde eine Stunde bei 38⁰ C im Wasserbad inkubiert. Gestoppt wird der Cycling-Prozeß durch 3-minütiges Erhitzen in kochendem Wasser.

Nach dem Abkühlen der Proben wurden jeweils 0,5 ml Phosphogluconat (PG)-Reagenz mit folgender Zusammensetzung zugegeben:

Zusammensetzung des PG-Reagenz:

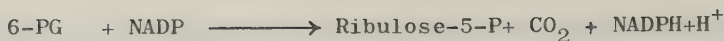
Trispuffer	(1 M)	0,6 ml
Ammoniumacetat	(5 M)	0,1 ml
EDTA	(0,1 M)	0,2 ml
Albuminlösung	(10 %)	0,2 ml
6-PG-DH	(12 E/ml)	0,2 ml
NADP -Lösung	(1,6 mg/ml)	1,0 ml
Aqua bidest.	ad	50,0 ml

Anschließend wurde bei 3000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das aus dem 6-PG gebildete NADPH wurde nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten im Überstand bei Raumtemperatur fluorimetisch unter Verwendung eines Zeiss Fluorimeter (Model PM Q II mit Fluorimeter Zusatz ZFM 4) gemessen.

2.3.2.7. Bestimmung von 6-Phosphogluconat (6-PG):

a) Prinzip.

6-PG wurde nach folgender Gleichung zu Ribulose-5-P und NADPH umgesetzt:



Das gebildete NADPH wurde durch enzymatisches Cycling gemessen nach dem gleichen Prinzip, wie es bereits für die G-6-P-Bestimmung (Abschnitt 2.3.2.6.) geschildert wurde.

b) Durchführung.

Die Inseln wurden, wie in den Abschnitten 2.3.2.4. u. 5 beschrieben, vorinkubiert, inkubiert und trockengesaugt. Jeweils 5 Inseln wurden in 10 μl NaOH (40 mM) gelöst, nach 10 Minuten erfolgt eine Zugabe von je 10 μl HCl (67 mM), um einerseits die NaOH zu neutralisieren und andererseits die Lösung anzusäuern. Das Gemisch wurde mit einem Mikromixer homogenisiert. Von dem Inselhomogenat wurden nun jeweils 15 μl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert.

Zum Zerstören von NADP und anderen störenden Substanzen in dem Inselhomogenat wurden die verschlossenen Gefäße 20 Minuten bei 60° C im Wasserbad erhitzt, anschließend im Eisbad abgekühlt, geöffnet und nach Zugabe von je 6 μl des Reaktionsgemisches (Zusammensetzung siehe Tabelle 1) wurde 30 Minuten bei 25° C inkubiert, wobei sich 6-PG mit NADP zu NADPH und Ribulose-5-P umsetzt. Überschüssiges NADP und das Enzym des Reaktionsgemisches wurden zerstört, indem mit je 6 μl NaOH (0,5 n) 20 Minuten bei 75° C erhitzt wurde. Für die Eichkurve wurden folgende 6-PG-Konzentrationen erstellt: 0,31; 0,62; 1,25; 2,50 und 5 pM 6-PG in 15 μl NaOH/HCl-Gemisch

(40 mM/46 mM, 1:1). Die Proben wurden wie oben angegeben behandelt.

Das Cycling-Verfahren, die Umsetzung zu NADPH und die fluorimetrische Messung wurden wie bei der G-6-P-Bestimmung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.2.6.).

2.3.2.8. Anpassung der Methodik an die früheren Untersuchungen von Ammon und Verspohl (46):

Um einen Teil der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden früherer Untersuchungen von Ammon und Verspohl vergleichen zu können, wurden bei den Versuchen mit G-6-P und 6-PG immer 5 Inseln in 1 ml Medium inkubiert, das die selben Konzentrationen an Glucose und exogenem Insulin enthielt wie vorgenannte Arbeit. So wurde es möglich, den Gehalt der Metaboliten der Glucose (G-6-P und 6-PG), mit ihren Daten über die durch Glucose-induzierte Netto-Insulinsekretion, den Quotienten aus

$\frac{^{14}\text{C-1-Glucose}}{^{14}\text{C-6-Glucose}}$ Oxidation und den $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}}$ -Quotienten in Beziehung

zu setzen.

2.3.3. Darstellung der Ergebnisse:

In den Abb. VI - XVII wurden auf der Ordinate die pro ml Effluat gemessenen Mengen an Insulin aufgetragen. Die Abszisse gibt die Zeit in Minuten an, nach der die Proben entnommen wurden.

Zur statistischen Berechnung von Unterschieden in der Insulinsekretion während der 1. oder 2. Phase der Stimulation (1. Phase = 2 - 4 Minuten, 2. Phase = 4 - 30 Minuten) wurden jeweils die Flächen unter den Insulinkurven abzüglich der Basalsekretion (= mittlere Insulinkonzentration zwischen -5 und +2 Minuten) herangezogen. Die Mengen an sezerniertem Insulin im Effluat werden als Mikroeinheiten immunoreaktiven Insulins pro ml ($\mu\text{E IRI/ml}$) angegeben. Der Gehalt der Langerhans'schen Inseln an den Metaboliten (G-6-P u. 6-PG) wird in Picomol (pM) / 5 Inseln angegeben.

2.3.4. Versuchsauswertung

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen angegebenen Zahl (n) von Versuchen.

Die Flächenberechnung der Insulinwerte unter den Sekretionskurven während der 1. und 2. Phase wurde für einen Olivetti Tischcomputer programmiert und von diesem berechnet.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student verwendet.

3. VERSUCHSERGEBNISSE

3.1. Isoliert-perfundiertes Rattenpankreas

3.1.1. Parachlormercuribenzoat (p-CMB)-induzierte Insulinsekretion:

Vor Beginn der Stimulationsversuche mit p-CMB wurde zunächst die Wirkung von 1 mg/ml Glucose auf die Insulinkonzentration des Effluats untersucht. Wie die Abb. VI zeigt, kommt es in Übereinstimmung mit den Angaben anderer Autoren (56) durch 1 mg/ml Glucose zu keiner signifikanten Zunahme der Insulinkonzentration. Eine solche fand sich jedoch, wenn neben Glucose 0,1 mM p-CMB im Perfusionsmedium waren (Abb. VII). Dabei zeigte sich die auch von anderen Autoren (37) beschriebene 2-phasige Sekretionsdynamik mit einem ersten Maximum 4 Minuten nach Beginn der Zufuhr von p-CMB. Nach 5 Minuten erreichte die Insulinkonzentration im Effluat ein Minimum von 350 μ E/ml, ohne jedoch auf die basale Insulinkonzentration zurückzugehen. Anschließend erfolgte ein zweiter langsamerer Anstieg der Insulinkonzentration im Medium mit einem Maximum nach 19 Minuten, dem dann erneut eine geringe Abnahme gegen Ende des hier gewählten Perfusionszeitraumes folgte.

3.1.1.1. Einfluß von Methylenblau (MB):

Bei Anwesenheit von 2 μ g/ml MB, sowohl während der Präperfusions-

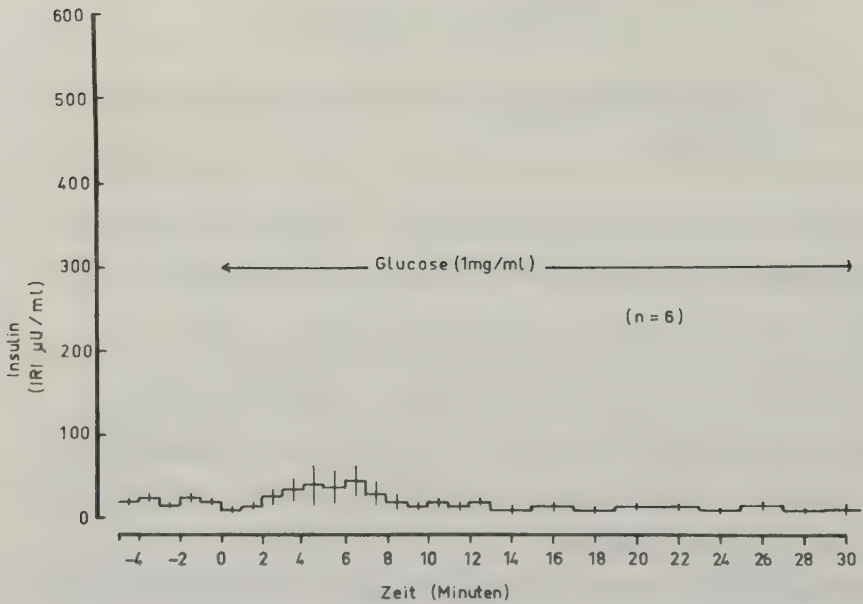


Abb. VI: Einfluss von 1 mg/ml Glucose auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

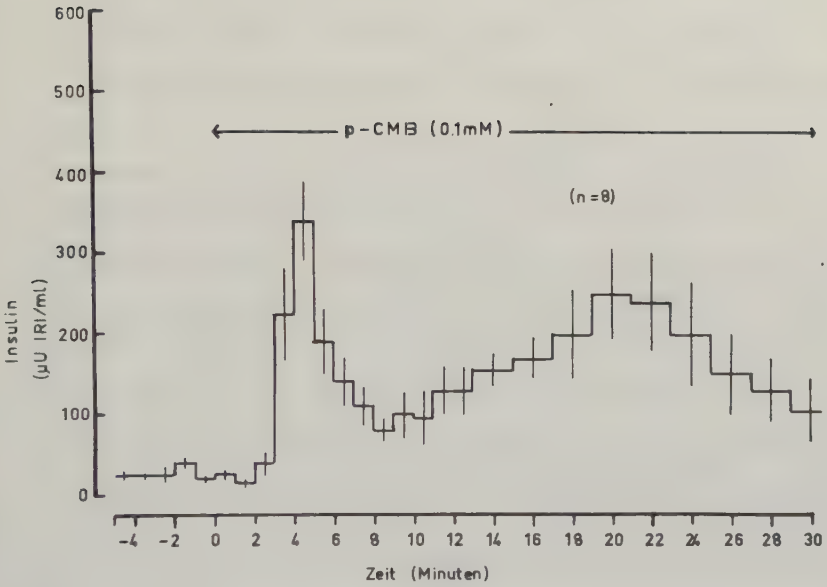


Abb. VII: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

zeit, als auch während der eigentlichen Perfusion, war, wie die Abb. VIII zeigt, die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB signifikant erniedrigt (Tab. II). Dies gilt sowohl für die 1. als auch für die 2. Phase der durch p-CMB induzierten Insulinsekretion. Um zu klären, ob MB möglicherweise selbst die β -Zelle in irreversibler Weise derart schädigt, daß sie auf einem Stimulus nicht mehr mit einer Insulinsekretion reagieren kann, wurde dem Präperfusionsmedium in einer weiteren Versuchsserie zunächst für 15 Minuten MB zugesetzt. Dann wurde während des Perfusionsvorganges mit einem Medium perfundiert, das Glucose und p-CMB, jedoch kein MB enthielt. Wie die Abb. IX zeigt, kommt es unter diesen Versuchsbedingungen zu einer 2-phasigen Insulinsekretion, die in ihrem Ausmaß etwa der entspricht, wie sie durch p-CMB ohne Vorbehandlung mit MB erzielt wurde (vgl. Abb. VII). Allerdings zeigte sich eine geringe zeitliche Verzögerung im Auftreten der beiden Phasen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß MB nicht zu einer größeren Schädigung der β -Zelle geführt hat, da diese in MB-freiem Medium auf p-CMB wieder mit einer Sekretion reagierte. Die geringe zeitliche Verschiebung der beiden Phasen ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in diesen Versuchen MB nicht sofort quantitativ ausgewaschen wurde und deshalb der Stimulus noch auf Reste von MB im Bereich der β -Zelle traf.

3.1.1.2. Einfluss von Diamid:

Bei Anwesenheit von 0,1 mM Diamid im Präperfusions- und Perfusions-

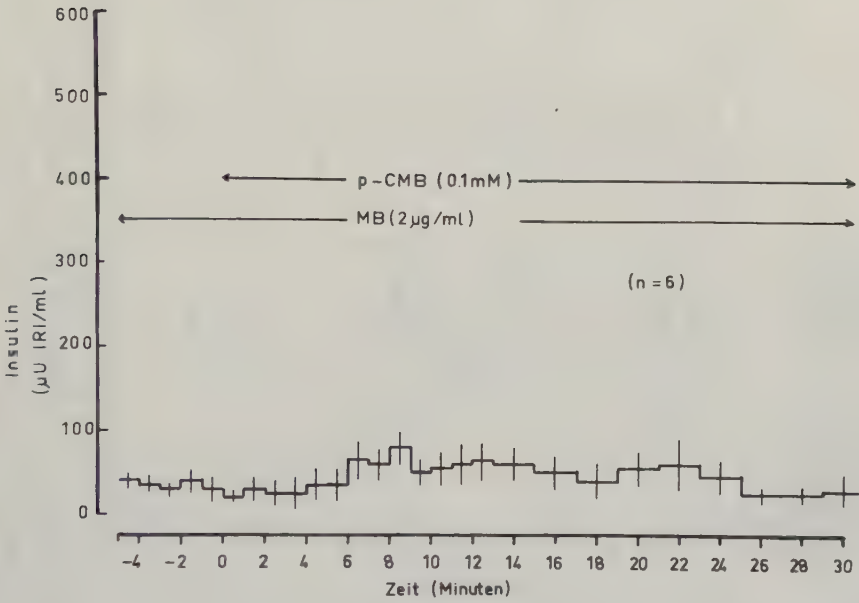


Abb. VIII: Einfluss von Methylenblau auf die durch p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) stimulierte Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

Tabelle 11: Insulinkonzentration im ausfließenden Medium (oberhalb der Basalwerte) während der 1. und 2. Phase der Insulinfreisetzung (Mittelwerte $\pm$ SEM.)

Nr.	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion (μ E IRI/ml)	
			1. Phase (2 - 4 min)	2. Phase (4 - 30 min)
1	Glucose (1 mg/ml)	6	53 $\pm$ 30	0
2	Glucose + p-CMB (1 mg/ml) (0,1 mM)	8	956 $\pm$ 183	6588 $\pm$ 1410
3	Glucose + p-CMB + MB (1 mg/ml) (0,1 mM) (2 μ E/ml)	6	28 $\pm$ 22	941 $\pm$ 584
4	Glucose + p-CMB + Diamid (1 mg/ml) (0,1 mM) (0,1 mM)	6	61 $\pm$ 26	4737 $\pm$ 1188
5	Glucose + p-CMB + Diamid (1 mg/ml) (0,1 mM) (1 mM)	6	0 $\pm$ 5	401 $\pm$ 183
6	Glucose + p-CMB + t-BHP (1 mg/ml) (0,1 mM) (2 mM)	6	80 $\pm$ 32	767 $\pm$ 631
7	Glucose + p-CMB + Exogenes Insulin (1 mg/ml) (0,1 mM) (400 μ E/ml)	6	172 $\pm$ 40	5718 $\pm$ 1035

Statistische Auswertung:

	1. Phase	2. Phase
1 vs 2	P < 0,001	P < 0,001
3 vs 2	P < 0,001	P < 0,001
4 vs 2	P < 0,001	P < 0,05
5 vs 2	P < 0,001	P < 0,001
6 vs 2	P < 0,001	P < 0,001
7 vs 2	P < 0,001	P < 0,05

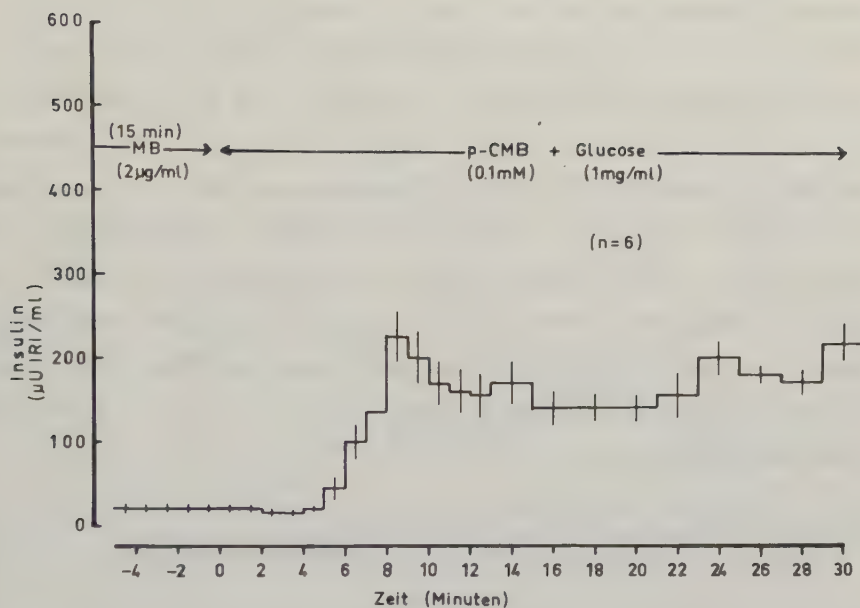


Abb. IX: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundenen Rattenpankreas, wenn 15 Minuten lang vor Zusatz von p-CMB durch Glucose mit 2 $\mu\text{g/ml}$ MB perfundiert wurde

medium war die durch p-CMB induzierbare Insulinsekretion ebenfalls signifikant erniedrigt (Abb. X, Tab. II). Eine vollständige Hemmung der Sekretion wurde mit 1 mM Diamid erzielt. Wie die Abb. XI zeigt, scheint auch Diamid nicht zu einer irreversiblen Schädigung der β -Zelle zu führen. Dies geht aus Versuchen hervor, bei denen während einer 15-minütigen Präperfusion dem Medium zunächst 0,1 mM Diamid zugesetzt worden war, anschließend aber ähnlich wie bei den Versuchen mit MB mit einem Diamid-freien jedoch p-CMB + Glucose enthaltenden Medium perfundiert wurde. Hier fand sich ebenfalls, wenn auch mit geringer zeitlicher Verzögerung wieder eine durch p-CMB stimulierbare Insulinsekretion. Dies läßt schließen, daß die β -Zelle auch durch Diamid nicht in irreversibler Weise geschädigt wird.

3.1.1.3. Einfluss von t-Butylhydroperoxid (t-BHP):

Auch bei Anwesenheit von t-BHP (2 mM) in der Präperfusion sowie im Perfusionsmedium wird die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB signifikant gehemmt (Abb. XII, Tab. II). Auch diese Wirkung des t-BHP ist, wie die Abb. XIII zeigt, reversibel, da bei Weglassen von t-BHP in der Perfusion p-CMB wieder eine 2-phasige Sekretion von Insulin auslöst. Allerdings kommt es auch hier, wie bereits beim MB und Diamid zu einer geringen zeitlichen Verzögerung.

3.1.1.4. Einfluss von exogenem Insulin:

Wie die Abb. XIV zeigt, bei Anwesenheit von 400 μ E/ml exogenem

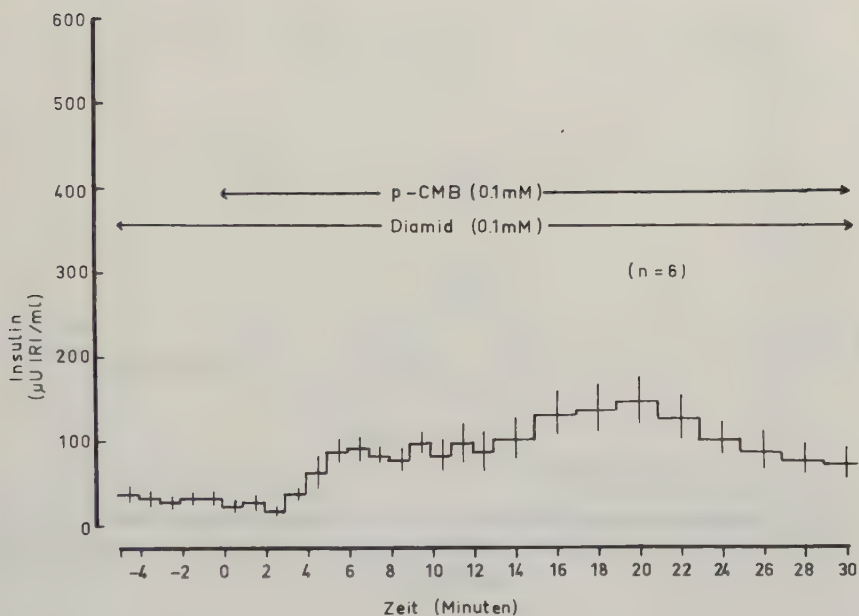


Abb. X: Einfluss von Diamid, auf die durch p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) stimulierte Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

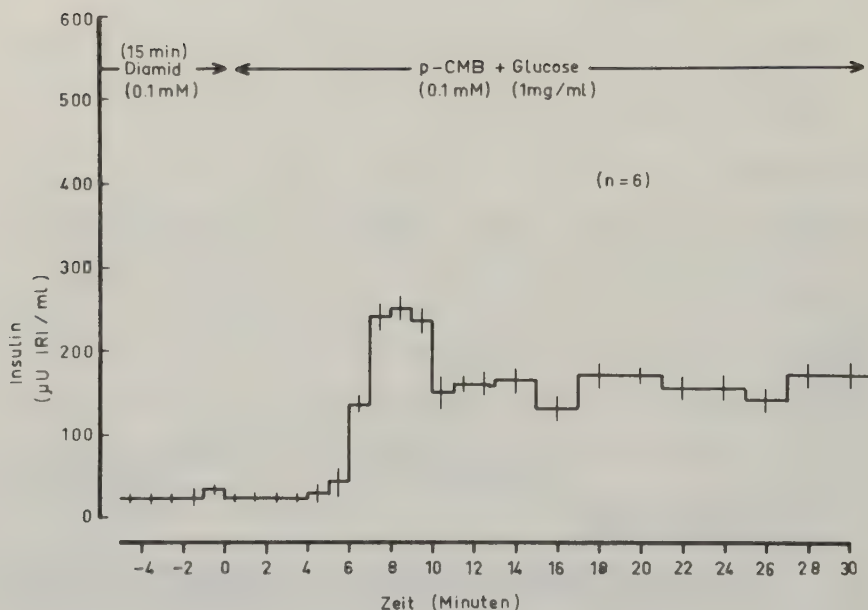


Abb. XI: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas, wenn 15 Minuten lang vor Zusatz von p-CMB durch Glucose mit 0,1 mM Diamid perfundiert wurde

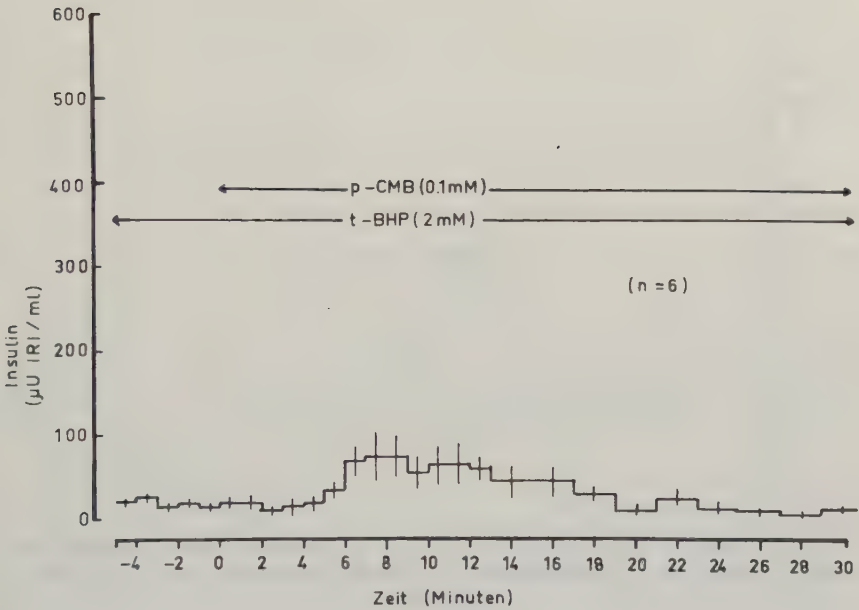


Abb. XII: Einfluss von t-BHP auf die durch p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) stimulierte Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

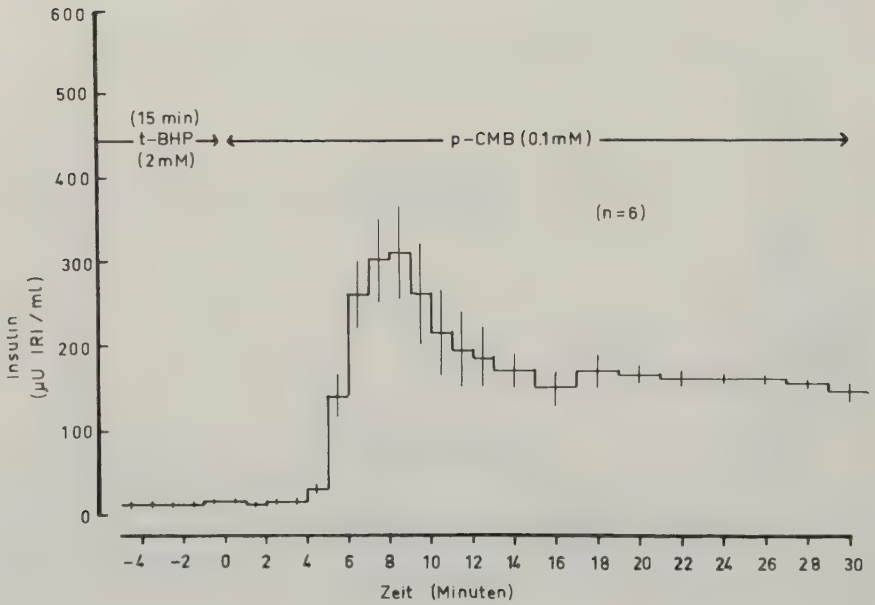


Abb. XIII: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas, wenn 15 Minuten lang vor Zusatz von p-CMB durch Glucose mit 2 mM t-BHP perfundiert wurde.

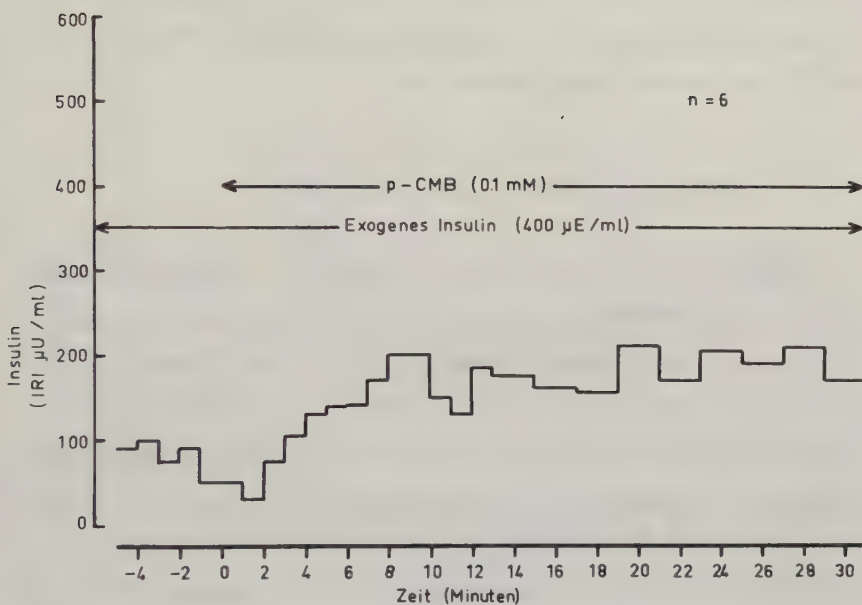


Abb. XIV: Einfluss von exogenem Insulin auf die durch p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) stimulierte Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas.

In dieser Abb. wurden Streuungen nicht angegeben, da es sich um Mittelwerte nach Abzug der zugesetzten Konzentration an exogenem Insulin handelt.

Insulin, sowohl während der Präperfusionszeit, als auch während der eigentlichen Perfusion, war die Insulin-freisetzende Wirkung von p-CMB (0,1 mM) + Glucose (1 mg/ml) erniedrigt (Tab. II). Dies gilt sowohl für die 1. als auch für die 2. Phase der durch p-CMB induzierten Insulinsekretion.

3.2.1. Leucin-induzierte Insulinsekretion:

In Gegenwart von 1 mg/ml Glucose führten 10 mM Leucin wie aus der Abb. XV hervorgeht, zu einer biphasischen Sekretion von Insulin. Da aus früheren Untersuchungen dieses Laboratoriums bekannt war, daß Leucin zu einer Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten in der Pankreasinsel führt (49), wäre nach der Arbeitshypothese von Ammon und Mitarb. (57) zu erwarten, daß durch die Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten über eine Zunahme des reduzierten Glutathions möglicherweise eine Zunahme freier SH-Gruppen auf der Membran der β -Zelle erfolgt. Unter dieser Voraussetzung könnte p-CMB auf mehr freie SH-Gruppen treffen und auf diese Weise möglicherweise einen stärkeren Sekretionsreiz ausüben.

Wie die Abb. XVI zeigt, findet sich in der Tat während der 1. und 2. Phase der Insulinsekretion eine Zunahme der Insulinsekretion im herausfließenden Effluat, die der Summe der bei p-CMB bzw. Leucin, alleine gemessen, entspricht (Tab.III u. vgl. mit Abb. VII und XV).

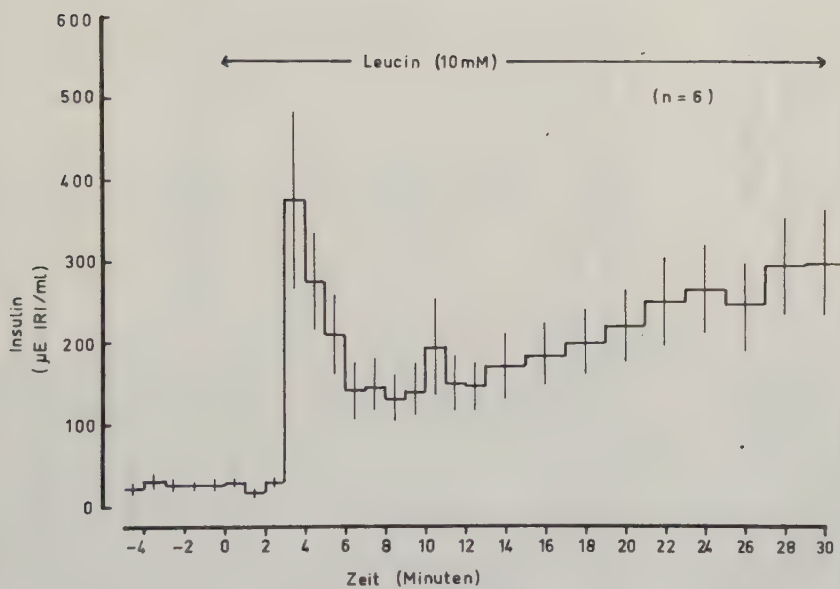


Abb. XV: Einfluss von 10 mM Leucin auf die Sekretion von Insulin
beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

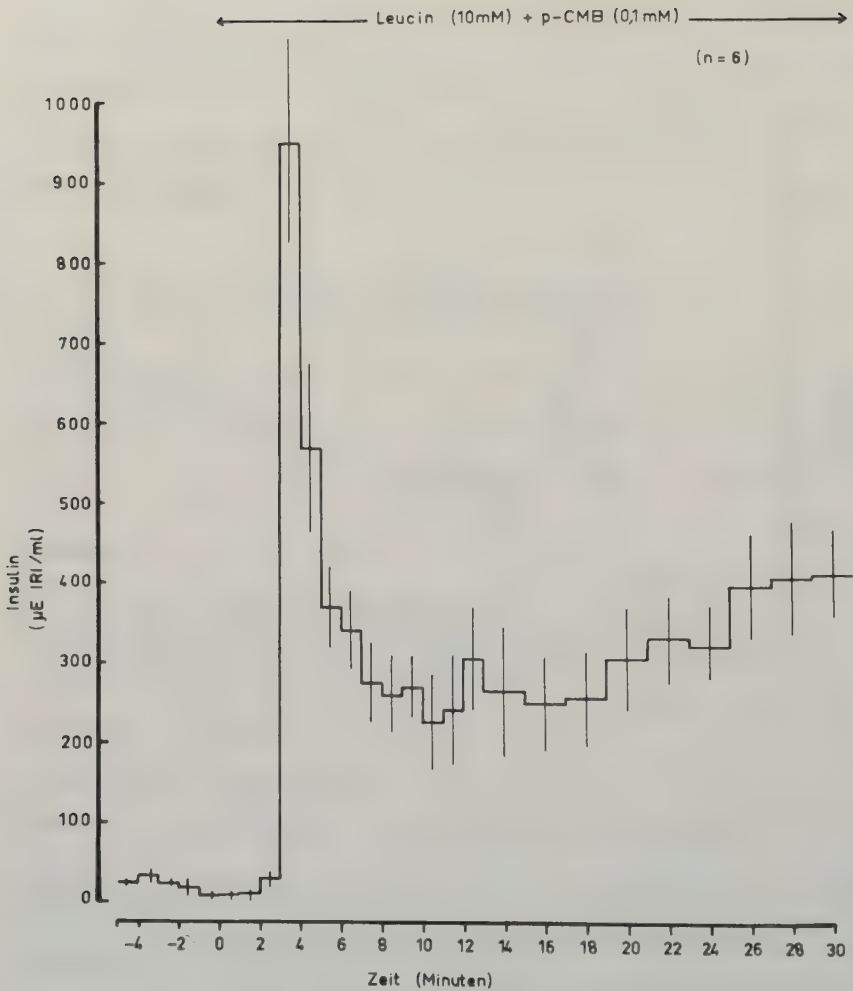


Abb. XVI: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Leucin (10 mM) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas

Tabelle III: Insulinkonzentration im ausfließenden Medium (oberhalb der Basalwerte) während der 1. und 2. Phase der Insulinfreisetzung (Mittelwerte $\pm$ SEM.)

Nr.	Zusätze	Anzahl der Versuche (n)	Insulinsekretion μ E IRI/ml	
			1. Phase (2 - 4 min)	2. Phase (4 - 30 min)
1	Glucose + p-CMB (1 mg/ml) (0,1 mM)	8	956 $\pm$ 183	6588 $\pm$ 1410
2	Glucose + Leucin (1 mg/ml) (10 mM)	6	825 $\pm$ 269	9427 $\pm$ 2329
3	Glucose + Leucin + p-CMB (1 mg/ml) (10 mM) (0,1 mM)	6	1868 $\pm$ 265	14919 $\pm$ 2762
4	Glucose + Leucin + p-CMB + t-BHP (1 mg/ml) (10 mM) (0,1 mM) (2 mM)	6	45 $\pm$ 11	1425 $\pm$ 190

Statistische Auswertung:

	1. Phase	2. Phase
1 vs 3	P < 0,05	P < 0,001
2 vs 3	P < 0,05	P < 0,05
3 vs 4	P < 0,001	P < 0,001

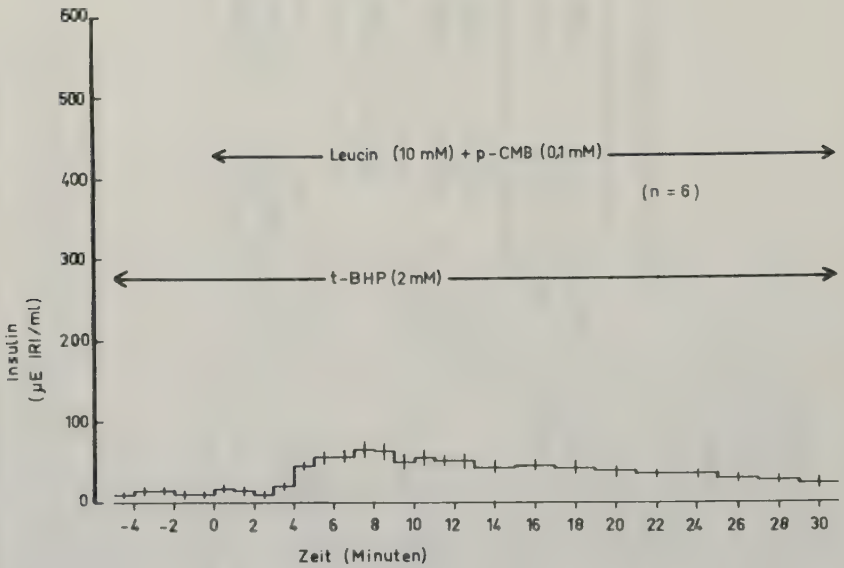


Abb. XVII: Einfluss von p-CMB (0,1 mM) + Leucin (10 mM) auf die Sekretion von Insulin beim isoliert-perfundierten Rattenpankreas, wenn 15 Minuten lang vor Zusatz von p-CMB durch Glucose mit 2 mM t-BHP perfundiert wurde

3.2.2. Einfluss von t-BHP

Die unter 3.2. beschriebene Kombinationswirkung von Leucin und p-CMB wird durch t-BHP deutlich gehemmt (Abb. XVII, Tab. III).

3.3. Isolierte Pankreasinseln

3.3.1. Glucose-6-Phosphat (G-6-P):

In der Abb. XVIII ist der Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen auf den Gehalt der Pankreasinseln an G-6-P nach 15- bzw. 90-minütiger Inkubationsdauer dargestellt. Wie dieser Abb. XVIII zu entnehmen ist, kommt es sowohl bei 15-minütiger als auch bei 90-minütiger Inkubationszeit, abhängig von der Glucosekonzentration, zur Zunahme von G-6-P (Tab. IV). Diese Zunahme war nach 90-minütiger Inkubationsdauer etwas stärker ausgeprägt als bei einer Inkubation über 15 Minuten. Eine statistische Berechnung der quantitativen Unterschiede bei verschiedener Inkubationsdauer (15 vs 90 Minuten) ist nicht durchgeführt worden, da beide Versuchsreihen nicht vergleichend angesetzt worden waren. Wie die Abb. XX zeigt, wird die insuläre Konzentration von G-6-P, bei Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose und einer Inkubationsdauer von 15 Minuten durch exogenes Insulin (200, 400 oder 800 μ E/ml) signifikant erhöht (Tab. VI).

3.3.2. 6-Phosphogluconat (6-PG):

Während G-6-P sowohl nach 15- als auch nach 90-minütiger Inkubations-

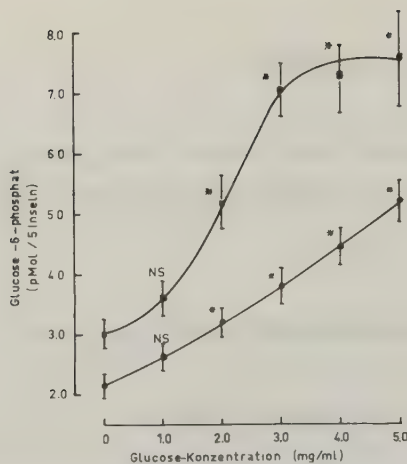


Abb. XVIII: Einfluss von Glucose auf die Konzentration von G-6-P Langerhans'scher Inseln nach 15-(●-●) bzw. 90-(■-■)-minütiger Inkubationsdauer
Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 22 - 27$; $* = P < 0,001$
NS = nicht signifikant

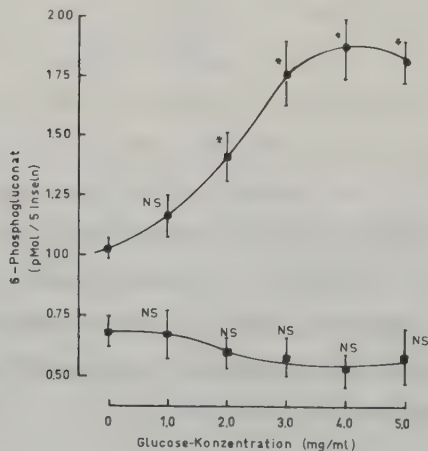


Abb. XIX: Einfluss von Glucose auf die Konzentration von 6-PG Langerhans'scher Inseln nach 15-(●-●) bzw. 90-(■-■)-minütiger Inkubationsdauer
Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 22 - 27$; $* = P < 0,001$
NS = nicht signifikant

Tabelle IV: Glucose-6-Phosphat Gehalt in Langerhans'schen Inseln von Ratten, inkubiert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Angabe in Picomol G-6-P/5 Inseln (Mittelwerte $\pm$ SEM.)

Inkubationszeit	Glucosekonzentration					
	0 (Kontrolle)	1 mg	2 mg	3 mg	4 mg	5 mg
15 Minuten	2,16 $\pm$ 0,14 (22) A	2,25 $\pm$ 0,18 (22) B	3,20 $\pm$ 0,19 (21) C	3,88 $\pm$ 0,19 (21) D	4,44 $\pm$ 0,25 (25) E	5,22 $\pm$ 0,30 (21) F
90 Minuten	2,99 $\pm$ 0,19 (22) G	3,62 $\pm$ 0,24 (28) H	5,23 $\pm$ 0,40 (25) I	7,19 $\pm$ 0,42 (26) J	7,27 $\pm$ 0,52 (17) K	7,55 $\pm$ 0,78 (11) L

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

A vs B	:	P > 0,05	G vs H	:	P > 0,05
A vs C	:	P < 0,001	G vs I	:	P < 0,001
A vs D	:	P < 0,001	G vs J	:	P < 0,001
A vs E	:	P < 0,001	G vs K	:	P < 0,001
A vs E	:	P < 0,001	G vs L	:	P < 0,001
D vs E	:	P < 0,05	J vs K	:	P > 0,05
D vs F	:	P < 0,05	J vs L	:	P > 0,05

Tabelle V: 6-Phosphogluconat-Gehalt in Langerhans'schen Inseln von Ratten, inkubiert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Angabe in Picomol 6-PG/ 5 Inseln (Mittelwerte $\pm$ SEM.)

Inkubationszeit	Glucosekonzentration / ml					
	0 (Kontrolle)	1 mg	2 mg	3 mg	4 mg	5 mg
15 Minuten	1,01 $\pm$ 0,05 (22) A	1,16 $\pm$ 0,09 (21) B	1,43 $\pm$ 0,10 (21) C	1,79 $\pm$ 0,16 (22) D	1,85 $\pm$ 0,15 (21) E	1,83 $\pm$ 0,09 (21) F
90 Minuten	0,67 $\pm$ 0,07 (12) G	0,67 $\pm$ 0,10 (12) H	0,59 $\pm$ 0,06 (12) I	0,58 $\pm$ 0,06 (12) J	0,52 $\pm$ 0,08 (12) K	0,59 $\pm$ 0,10 (12) L

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

AB :	P > 0,05	GH :	P > 0,05
AC :	P < 0,001	GI :	P > 0,05
AD :	P < 0,001	GJ :	P > 0,05
AE :	P < 0,001	GK :	P > 0,05
AF :	P < 0,001	GL :	P > 0,05
DE :	P > 0,05	JK :	P > 0,05
DF :	P > 0,05	JL :	P > 0,05

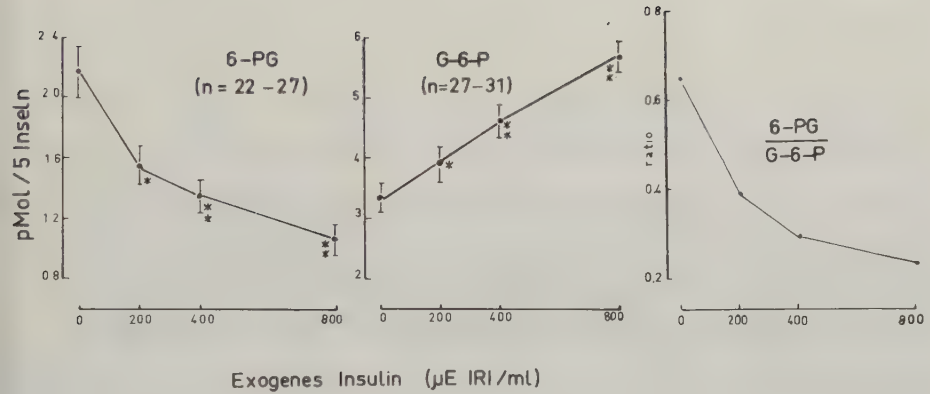


Abb. XX: Einfluss von exogenem Insulin auf 6-PG, G-6-P sowie den 6-PG/G-6-P-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose
Mittelwerte $\pm$ SEM, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,001$

dauer in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zunahm, zeigte 6-PG unter ähnlichen Bedingungen ein anderes Verhalten. Bei einer Inkubationsdauer von 15 Minuten kam es, wie die Abb. XIX zeigt, abhängig von der Glucosekonzentration, zu einem signifikanten Anstieg der 6-PG-Konzentration. Wurde dagegen über 90 Minuten inkubiert, so zeigte sich keine von der Glucosekonzentration abhängige Zunahme (Tab. V). Auch bei Zusatz von exogenem Insulin unterschied sich das Verhalten des 6-PG von dem des G-6-P. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten fand sich bei Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose und Gegenwart von 200, 400 oder 800 μ E/ml exogenem Insulin eine dosisabhängige Abnahme der 6-PG-Konzentration (Abb. XX) während bei G-6-P eine Zunahme zu beobachten war.

3.3.3. 6-Phosphogluconat/Glucose-6-Phosphat (6-PG/G-6-P)-Quotient:

Der 6-PG/G-6-P-Quotient wird als Maß für die Aktivität der Glucose-6-phosphatdehydrogenase angesehen. Eine Abnahme dieses Quotienten spricht für eine verminderte Überführung von Glucose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconat. Wie die Abb. XX zeigt, in der der 6-PG/G-6-P-Quotient - berechnet aus den in den Abb. XX gezeigten Werten für G-6-P bzw. 6-PG bei Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose nach einer Inkubationsperiode von 15 Minuten - dargestellt ist, führt exogenes Insulin dosisabhängig zu dessen Abnahme von 0,64 auf 0,39, 0,29 und 0,20 (Tab. VI).

Tabelle VI: Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und 6-Phosphogluconat (6-PG) und $\frac{6-PG}{G-6-P}$ -Quotienten der Langerhans'schen Inseln, 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen an exogenem Insulin inkubiert, in Gegenwart von Glucose (3 mg/ml).

Parameter	Konzentration an Exogenem Insulin / ml			
	0 (kontrolle)	200 μ E	400 μ E	800 μ E
G-6-P pMol $\pm$ SEM/ 5 Inseln	3,39 $\pm$ 0,15 (27) A	3,95 $\pm$ 0,22 (31) B	4,64 $\pm$ 0,20 (28) C	5,21 $\pm$ 0,26 (28) D
6-PG pMol $\pm$ SEM/ 5 Inseln	2,16 $\pm$ 0,16 (27) E	1,55 $\pm$ 0,13 (25) F	1,35 $\pm$ 0,13 (25) G	1,05 $\pm$ 0,11 (22) H
$\frac{6-PG}{G-6-P}$ -Quo- tienten	0,64	0,39	0,29	0,20

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

A vs B	:	P < 0,05	E vs F	:	P < 0,05
A vs C	:	P < 0,001	E vs G	:	P < 0,001
A vs D	:	P < 0,001	E vs H	:	P < 0,001

3.3.4. Beziehung zwischen 6-PG/G-6-P-Quotient und NADPH/-
NADP-Quotient, PPS-Aktivität und Sekretion von Insulin
in Gegenwart von exogenem Insulin:

In den Abbildungen XXI, XXII und XXIII wurde der hier in Gegenwart von exogenem Insulin bestimmte 6-Phosphogluconat/Glucose-6-Phosphat-Quotient in Korrelation zu dem von Ammon und Verspohl (46) bestimmten NADPH/NADP-Quotienten bzw. dem Quotienten $\frac{^{14}\text{C-1-Glucose}}{^{14}\text{C-6-Glucose}}$ - Oxidation (als rohes Maß für die Aktivität des Pentosephosphatshuntes) und der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion gesetzt. Dabei zeigt sich, daß eine enge Korrelation zwischen der hier gefundenen Abnahme des 6-Phosphogluconat/Glucose-6-Phosphat-Quotienten und der Abnahme der Aktivität des Pentosephosphatshuntes, des NADPH/NADP-Quotienten und der Hemmung der Insulinsekretion bestand.

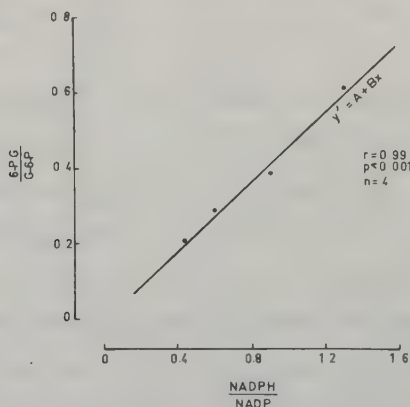


Abb. XXI: Korrelation zwischen der durch exogenes Insulin verursachten Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten und des NADPH/NADP-Quotienten Langerhans'scher Inseln der Ratte. Die Werte für den 6-PG/G-6-P-Quotienten wurden der Abb. XX entnommen, die Werte für den NADPH/NADP-Quotienten entstammen der Arbeit von Ammon und Verspohl (46)

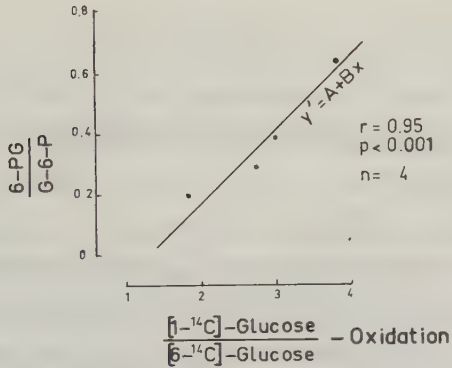


Abb. XXII: Korrelation zwischen der durch exogenes Insulin verursachten Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten und des 1-¹⁴C Glucose-Oxidation/6-¹⁴C Glucose-Oxidation-Quotienten Langerhans'scher Inseln der Ratte. Die Werte für den 6-PG/G-6-P-Quotienten wurden der Abb. XX entnommen, die Werte für den 1-¹⁴C Glucose-Oxidation/6-¹⁴C Glucose-Oxidation-Quotienten entstammen der Arbeit von Ammon und Verspohl (46)

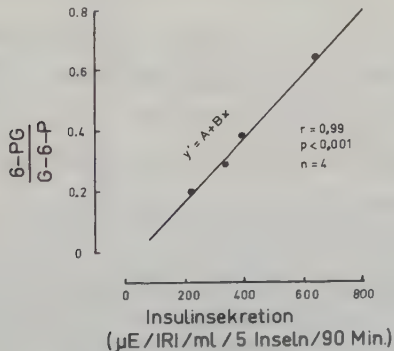


Abb. XXIII: Korrelation zwischen der durch exogenes Insulin verursachten Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten und der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion Langerhans'scher Inseln der Ratte. Die Werte für den 6-PG/G-6-P-Quotienten wurden der Abb. XX entnommen, die Werte für die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion entstammen der Arbeit von Ammon und Verspohl (46)

4. D I S K U S S I O N

4.1. Bedeutung von SH-Gruppen für die Insulinsekretion der β -Zelle:

Kürzlich wurde wahrscheinlich gemacht, daß dem NADPH, dem Hauptprodukt des PPS, eine Rolle bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion zukommt. Dies basierte auf der Beobachtung, daß der NADPH/NADP-Quotient der Pankreasinseln mit der Glucosekonzentration ansteigt (58) und daß eine Abnahme dieses Quotienten, z.B. in Gegenwart von Methylenblau, zu einer verminderten Insulinsekretionsantwort der β -Zelle auf Glucose führt (45). Weitere Beobachtungen, die ebenfalls für diese Annahme sprechen, sind die Befunde, nach denen die Abnahme des NADPH-Spiegels in den Inseln, hervorgerufen durch 6-AN (10), in vitro-Zugabe von exogenem Insulin (46) oder ausgelöst durch Hunger (59), ebenfalls mit einer Abnahme der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergingen. Auch der umgekehrte Fall konnte beobachtet werden: eine durch Leucin hervorgerufene Steigerung der Insulinsekretion war mit einer Zunahme des NADPH/NADP-Quotienten verbunden (49).

Bisher ist, wie einleitend gesagt, nur wenig bekannt darüber, wie das Glucosemolekül als solches (wenn überhaupt) als Initiator der Insulinsekretion fungiert, und wie p-CMB, das nur in geringem Umfang durch die Zellmembran tritt, die Insulinsekretion stimuliert: eine Möglichkeit des letzteren wäre dessen Reaktion mit freien Thiolgruppen in der Zellmembran unter Bildung von schnell reversiblen Mercaptiden (37). Dies setzt allerdings das Vorhandensein von freien SH-Gruppen in der β -Zellmembran voraus. Da NADPH im extramitochond-

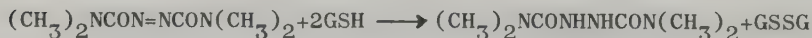
rialen Zytoplasma stark reduzierend wirkt, ist es naheliegend, daß es auch einen Einfluß auf den Redoxzustand solcher Thiol-Gruppen besitzt, die in Zusammenhang mit der Insulinsekretion gebracht werden. Indem wir, in Anlehnung an die Versuche von Ammon et al. (58) Methylenblau (2 µg/ml) als pharmakologisches Werkzeug verwendeten, um den Gehalt der Inseln an NADPH zu verringern, sollte geprüft werden, ob der Insulin-freisetzende Effekt von p-CMB von der NADPH-Konzentration in der Insel abhängt.

Methylenblau in einer Konzentration von 2 µg/ml senkt selektiv, wie frühere Untersuchungen von uns zeigten, den intrazellulären Gehalt an NADPH, jedoch nicht den von NADH und ATP (58); es hatte in dieser Konzentration auch keinen Effekt auf die Glykolyse (Embden-Meyerhoff-Weg) und den Inselgehalt an Insulin, der radioimmunologisch gemessen war (10). Auch ist der hemmende Effekt von Methylenblau auf die durch p-CMB hervorgerufene Insulinsekretion reversibel (Fig. IX), was gegen eine unspezifische Schädigung der β-Zelle durch MB spricht.

Die Hemmung der insulinsekretorischen Wirkung von p-CMB durch Methylenblau (Abb. VIII) läßt vermuten, daß diese vom NADPH der Pankreasinsel abhängt. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen neuerer Untersuchungen, die zeigen, daß auch die Glucose-induzierte Insulinsekretion von der Höhe des NADPH/NADP-Quotienten abhängt. (57).

Es wird angenommen, daß die Thiolgruppen in der Zellmembran wenigstens teilweise im Gleichgewicht mit intrazellulärem GSH stehen (60) und es ist bekannt, daß Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) durch die Glutathionreduktase mit Hilfe von NADPH als Wasserstoffdonator durchgeführt wird (36). Aus der Sicht unserer Ergebnisse hängt die durch p-CMB hervorgerufene Insulinsekretion von dem Inselgehalt an NADPH ab und es ist denkbar, wie schon früher von uns und anderen vermutet (31,61), daß NADPH eine wichtige Rolle in der Pankreasinsel dadurch spielt, daß es Glutathion im reduzierten Zustand hält; GSH ist ein wichtiges Reduktionsmittel für Proteindisulfide. Wenn diese Theorie stimmt, dann müsste der Insulin-sekretorische Effekt von p-CMB auch nach Gabe von Substanzen, die direkt den GSH-Gehalt der Zellen vermindern, gehemmt werden.

Um dies zu prüfen, wählten wir mit dem Diamid eine Substanz aus, die imstande ist, den intrazellulären Gehalt von Gewebe an GSH zu vermindern (62). Diamid oxidiert sehr schnell das intrazelluläre GSH von Erythrocyten (63) nach folgender Reaktion:



Im Gegensatz zu p-CMB kann Diamid sehr leicht die Zellmembran passieren und GSH zum Disulfid oxidieren. Wie in Abb. X gezeigt ist, werden beim perfundierten Pankreas in Gegenwart von 0,1 mM Diamid beide Phasen der durch p-CMB stimulierten Insulinsekretion signifikant gehemmt, wobei, ähnlich wie beim MB, dieser Effekt reversibel ist.

Obwohl der Hemmwirkung von Diamid keine unspezifische Schädigung der β -Zelle zugrundeliegen dürften, können wir jedoch aufgrund der bisherigen Befunde noch keine weitreichenden Schlüsse ziehen. Das liegt daran, daß metabolische Inhibitoren als pharmakologisches Werkzeug nicht absolut spezifisch sein müssen, und daß es bisher keine Daten gibt, die zeigen, daß Diamid auch in der Pankreasinsel den Gehalt an GSH verringert. Deshalb entschlossen wir uns, für die gleiche Fragestellung einen weiteren Hilfsstoff in unsere Untersuchungen einzubeziehen, der den intrazellulären Gehalt an GSH auf einem ganz anderen Weg verringern kann, als vorher beschrieben für Diamid; es handelte sich dabei um das t-BHP (64). Hydroperoxide werden durch die Glutathionperoxidase in Gegenwart von GSH reduziert; GSH selbst wird dabei zu GSSG oxidiert. Demnach führt ein Überschuss an Hydroperoxiden in der Zelle zu einem GSH-Mangel. In unseren Versuchen verwendeten wir t-Butylhydroperoxid (t-BHP), das nach früheren Untersuchungen GSH in Erythrozyten und Leber in GSSG überführt, indem es nach folgender Gleichung als Substrat der Glutathionperoxidase (64,65) fungiert:

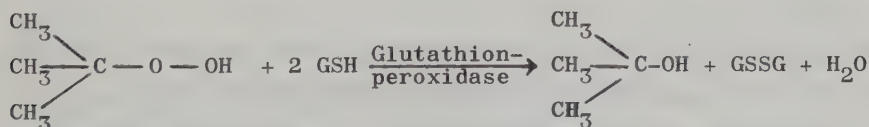


Abb. XII zeigt, daß t-BHP die durch p-CMB stimulierbare Insulinsekretion beim perfundierten Pankreas während beider Phasen hemmt. Wenn man annimmt, daß t-BHP den GSH-Spiegel, wie in anderen Geweben, so auch in den Inseln senkt, würden auch diese Ergebnisse dafür

sprechen, daß GSH für den Insulin-freisetzenden Effekt von p-CMB wichtig ist. Ähnliche Befunde wurden kürzlich auch für die Insulin-freisetzende Wirkung der Glucose erhoben (57). Wie oben erwähnt, hält GSH andere Thiol-Gruppen in reduziertem Zustand (60). Es ist daher denkbar, daß GSH auch diejenigen SH-Gruppen in/auf der Zellmembran in reduziertem Zustand hält, die in einen Zusammenhang mit der durch p-CMB induzierten Insulinsekretion gebracht werden. Nach Pagliara et al. (16) sollen auch Glucose und andere Thiol-Reagenzien die Insulinsekretion dadurch stimulieren, daß sie auf SH-Gruppen wirken, die in einer Verbindung mit dem von Matschinsky et al. (6,66) postulierten Glucoserezeptor in der Zellmembran stehen. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde sowie die Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen mit Glucose als Stimulator, die in diesem Laboratorium erhalten wurden, scheinen mit letzterer Hypothese in Einklang zu stehen.

Aus der Sicht der bisher diskutierten Ergebnisse kann keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit GSH irgendetwas mit einem Initiator für die Freisetzung von Insulin zu tun hat. Sie unterstützen aber die bereits früher aufgestellte Hypothese, daß Glucose-Metabolismus über den oxidativen PPS für die Produktion von NADPH notwendig ist, wobei NADPH Glutathion in reduziertem Zustand hält. Darüber-hinaus lassen sie vermuten, daß GSH möglicherweise u.a. dazu benötigt wird, um auf einem bisher unbekannten Weg solche Thiol-Gruppen in der β -Zellmembran in reduziertem Zustand zu halten, die in einem Zusammenhang mit der

Insulinsekretion stehen. Diese Hypothese schließt ein, daß der Redoxzustand der Thiol-Gruppen in der β -Zellmembran, die - wenn überhaupt - irgendeine Rezeptorfunktion für ein gegebenes Signal haben, möglicherweise für die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber diesem Initiator verantwortlich sind.

Zu dieser Hypothese paßt, daß Leucin die p-CMB-induzierte Insulinsekretion synergistisch beeinflußt (Tab. III, Abb. XVI). Es ist möglich, daß Leucin durch die Erhöhung des NADPH/NADP-Quotienten via GSH zur Vermehrung der für die Wirkung von p-CMB postulierten SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle führt.

Zur Zeit gibt es 3 physiologische Situationen, die mit dieser Hypothese in Einklang zu bringen wären:

- 1) Während der Feedback-Hemmung der Insulinfreisetzung durch exogenes Insulin tritt gleichzeitig eine Hemmung des PPS und eine Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten in Inseln auf (46).
- 2) Die verringerte sekretorische Antwort der β -Zelle auf einen Glucosereiz im Hungerzustand geht auch mit einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten in Pankreasinseln einher (59).
- 3) Inseln foetaler Ratten verfügen über keine meßbare Oxidation von Glucose im PPS und geben auf Glucosereiz kein Insulin ab (30).

Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß neuerdings auch für Acetylcholin und adrenerge Rezeptoren SH-Gruppen eine Bedeutung haben sollen (67 - 69).

4.2. PPS und Feedback-Hemmung der Insulinsekretion:

Wie wir kürzlich in unserem Laboratorium zeigen konnten, hemmt exogenes Insulin die Aktivität des PPS in isolierten Inseln (46). Es war jedoch nicht klar, auf welche Weise exogenes Insulin diese Wirkung ausübt.

Der PPS wird in erster Linie an seinem Schlüsselenzym, der G-6-P-Dehydrogenase, reguliert (47,70). Da dem PPS, wie bereits ausgeführt, eine Rolle im Mechanismus der Insulinsekretion zukommt, wäre durch seine Steuerbarkeit eine quantitative Kontrolle der Insulinsekretion möglich.

Mit den derzeitig verfügbaren Methoden ist die direkte Aktivitätsbestimmung der G-6-P-Dehydrogenase unter Bedingungen der lebenden Zelle schwierig. Ausdruck der Aktivität dieses Enzyms ist jedoch indirekt der $\frac{6-PG}{G-6-P}$ -Quotient. Beide Metaboliten - Substrat und Produkt der G-6-P-Dehydrogenase - können mit Hilfe von enzymatischen Cycling-Methoden in so geringen Gewebsmengen, wie sie bei isolierten Inseln (ca. 3 μ g Feuchtgewicht pro Insel) nur zur Verfügung stehen, sauber gemessen werden. Es wurde daher das Verhalten dieses Quotienten in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an exogenem Insulin untersucht und

zu der bereits früher beschriebenen Hemmung des PPS in Beziehung gesetzt.

Bevor wir den Einfluss von exogenem Insulin auf den Gehalt der Pankreasinsel an G-6-P und 6-PG bestimmten, war es nötig, den Einfluss der Glucosekonzentration und der Inkubationsdauer kennenzulernen.

Wie die Abbildungen XVIII u. XIX zeigen, findet sich nach einer 15-minütigen Inkubationsdauer sowohl beim 6-PG als auch beim G-6-P eine von der Glucosekonzentration abhängige Zunahme. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen von Montague et al. (71) und Ashcroft et al. (72), die ebenfalls einen Anstieg fanden. Bereits früher wurde eine Zunahme beider Metaboliten in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei Inseln von fettsüchtigen, hyperglykämischen Mäusen beobachtet (26,73). Interessanterweise findet sich dagegen bei einer Inkubationsdauer von 90 Minuten kein signifikanter Anstieg beim 6-PG, während beim G-6-P wiederum eine Zunahme zu beobachten war.

Bei unseren Versuchen mit exogenem Insulin wurde eine Inkubationsdauer von 15 Minuten gewählt, da, wie oben gezeigt, sowohl G-6-P als auch 6-PG unter diesen Bedingungen glucoseabhängig zunahmen. Wie der Abb. XX zu entnehmen ist, führt exogenes Insulin in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose konzentrations-

abhängig zur Abnahme von 6-PG sowie zur Zunahme von G-6-P. Daraus errechnet sich eine Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten. Die Abnahme des 6-PG kann theoretisch 2 Gründe haben: 1. eine verminderte Bildung, 2. eine gesteigerte Utilisation. Für eine gesteigerte Utilisation bestehen keine Hinweise, da, wie von Ammon und Verspohl (46) gezeigt, unter dem Einfluss von exogenem Insulin die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus ^{14}C -1-Glucose sogar vermindert ist. Dagegen ist die 1. Möglichkeit - eine verminderte Bildung - wahrscheinlicher, da trotz erhöhtem G-6-P eine Abnahme von 6-PG zu beobachten ist. Wie bereits oben ausgeführt, wird der 6-PG/G-6-P-Quotient als ein Maß für die Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase angesehen. Wie die Abb. XX zeigt, errechnet sich bei Anwesenheit von exogenem Insulin eine von der Insulinkonzentration abhängige Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten. Dies läßt auf eine Verminderung der Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase schliessen. Ob es sich dabei um einen direkten oder einen indirekten Effekt des exogenen Insulins handelt, läßt sich aus unseren Versuchsergebnissen nicht sagen. Wie die Abb. XXII zeigt, korreliert die Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten mit der Abnahme des Quotienten aus ^{14}C -1-/ ^{14}C -6-Glucoseoxidation, wie sie von Ammon und Verspohl (46) gefunden wurde. Dies spricht dafür, daß die aufgrund des Oxidationsquotienten vermutete Hemmung der Pentosephosphatshuntaktivität im Zusammenhang mit der Hemmung der G-6-P-Dehydrogenase zu sehen ist. Die Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten korreliert aber auch mit der von Ammon und Verspohl (46) beschriebenen Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten (Abb. XXI).

NADPH stellt ein Produkt des PPS dar, es ist daher denkbar, daß es durch die Hemmung der G-6-P-Dehydrogenase zu einer Hemmung der NADPH-Bildung und damit zu einer Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten kommt. Von Ashcroft und Mitarb. wurde allerdings beschrieben, daß die Aktivität des PPS in der Pankreasinsel von eben diesem NADPH/NADP-Quotienten reguliert wird (74). Es handelte sich dabei aber nicht um Studien an lebenden Zellen, sondern an Inselhomo-genaten. Da in unserem Falle trotz Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten auch die Aktivität des PPS erniedrigt war, muß angenommen werden, daß der regulierende Effekt von exogenem Insulin auf den PPS über die G-6-P-Dehydrogenase dem regulierenden Effekt des NADPH/NADP-Quotienten übergeordnet ist.

Wie die Abb. XXIII zeigt, korreliert die Abnahme des 6-PG/G-6-P-Quotienten auch mit der von Ammon und Verspohl (46) beschriebenen Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch exogenes Insulin. Da eine solche Korrelation der Sekretions-hemmung nicht nur mit dem 6-PG/G-6-P-Quotienten, sondern auch mit der Abnahme der PPS-Aktivität und der Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten beschrieben wurde (46), dürfte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem regulativen Eingriff von exogenem Insulin auf den PPS via G-6-P-Dehydrogenase und der Feedback-hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion bestehen.

Im Lichte der eben diskutierten Zusammenhänge ist es leicht zu erklären, warum wir weiter oben keinen Anstieg des 6-PG in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration bei 90-minütiger Inkubationsdauer beobachten konnten. Normalerweise werden nach 15

Minuten Inkubation nur sehr geringe Mengen an Insulin an das Medium abgegeben. Nach 90 Minuten finden sich jedoch sezernierte Mengen an Insulin, die über die von uns zugesetzte Mengen an exogenem Insulin hinausgehen können. Es ist daher anzunehmen, daß bei einer 90-minütigen Inkubation, insbesondere in Gegenwart von solchen Glucosekonzentrationen, die ihrerseits in der Lage sind, Insulin freizusetzen, Insulin in einem Umfang an das Inkubationsmedium abgegeben wurde, welches seinerseits nun die Aktivität der G-6-P-Dehydrogenase hemmt, ähnlich wie dies bei Zusatz von exogenem Insulin geschieht.

4.3. SH-Gruppen und Feedback-Hemmung der Insulinsekretion:

Es wurde bereits oben diskutiert, daß die Aufgabe des PPS bei der Insulinsekretion die sein könnte, NADPH zu bilden, welches seinerseits zur Reduktion von GSSG führt. GSH könnte dann für die Sekretion wichtige SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle in reduziertem Zustand halten. Aufgrund der eben diskutierten Wirkungen von exogenem Insulin auf PPS und den NADPH/NADP-Quotienten ist es denkbar, daß exogenes Insulin über eine Hemmung des PPS und die Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten zu einer Verminderung von reduziertem Glutathion und damit auch zu einer Verminderung von freien SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle führt. Es wäre daher denkbar, daß exogenes Insulin auf diese Weise - im Sinne der Feedback-Hemmung seiner Sekretion - die Ansprechbarkeit der β -Zelle gegenüber solchen Stimulatoren der Insulinsekretion herabsetzen könnte, die für ihre Wirkung das

Vorhandensein von freien SH-Gruppen in der β -Zelle benötigen. Für die Glucose wurde bereits gezeigt, daß exogenes Insulin deren stimulatorische Wirkung hemmt, und von Pagliara u. Mitarb. wurde darauf hingewiesen, daß Glucose für ihre Insulin-freisetzende Wirkung freie SH-Gruppen in der β -Zellmembran benötigt (16). Um diese Hypothese weiter zu festigen, untersuchten wir jetzt, ob exogenes Insulin auch die durch p-CMB induzierte Insulinsekretion - die ja ebenfalls an das Vorhandensein freier SH-Gruppen in der β -Zelle (wie oben ausführlich diskutiert) gebunden ist - hemmt. Wie die Abb. XIV zeigt, findet sich in der Tat in Gegenwart von 400 μ E/ml exogenem Insulin beim perfundierten Pankreas der Ratte eine signifikante Hemmung der durch p-CMB induzierbaren Freisetzung von Insulin. Dieser Befund spricht dafür, daß der Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion möglicherweise darin besteht, daß exogenes Insulin durch Kontrolle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die Aktivität des PPS, die Höhe des NADPH/NADP-Quotienten, den Redoxzustand des intrazellulären Glutathions und über diese auf unbekannte Weise auch den Redoxzustand solcher SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle regelt, die für die Empfindlichkeit der β -Zelle gegenüber einem Initiator wie Glucose oder p-Chlormercuribenzoat verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu untermauern.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen weiterhin die Spekulation zu, daß durch Stoffe, die entweder die Aktivität des PPS, den NADPH/NADP-Quotienten oder den Redoxzustand des

reduzierten Glutathions beeinflussen, eine Steigerung oder eine Hemmung der Insulinsekretion für therapeutische Zwecke möglich ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- 5.1. In vorliegender Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit SH-Gruppen der β -Zelle der Langerhans'schen Insel in einer Beziehung zur Insulinsekretion stehen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:
- 5.2. p-Chlormercuribenzoat, ein Thiolreagenz, das mit freien SH-Gruppen in der Membran der β -Zelle unter Bildung eines Merkaptids reagiert, führt beim isoliert-perfundierten Pankreas der Ratte, in Gegenwart von Glucose, zu einer biphasischen Sekretion von Insulin.
- 5.3. Methylenblau, das den Gehalt der Langerhans'schen Insel an NADPH durch Oxidation herabsetzt, hemmt diese Wirkung von p-Chlormercuribenzoat.
- 5.4. Die Insulin-freisetzende Wirkung von p-Chlormercuribenzoat wird auch durch Diamid, einem Oxidationsmittel von reduziertem Glutathion und t-Butylhydroperoxid, einem Substrat der Glutathionperoxidase, das ebenfalls zu einer Verminderung des intrazellulären reduzierten Glutathions führt, gehemmt.
- 5.5. Leucin, eine Aminosäure, die zur Zunahme von NADPH in der Langerhans'schen Insel führt, steigert die durch p-Chlormercuribenzoat induzierte Sekretion von Insulin.

- 5.6. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß die Insulin-freisetzende Wirkung von p-Chlormercuribenzoat vom β -zellulären NADPH sowie von dessen reduziertem Glutathion abhängt. Es ist denkbar, daß Thiol-Gruppen in der Membran der β -Zelle, die für die Insulin-freisetzende Wirkung von p-Chlormercuribenzoat von Wichtigkeit sind, über die Kette von $\text{PPS} \longrightarrow \text{NADPH} \longrightarrow \text{GSH}$ in reduziertem Zustand gehalten werden.
- 5.7. In einem 2. Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die durch exogenes Insulin hervorgerufene Hemmung der Glucose-induzierbaren Insulinsekretion durch einen regulativen Eingriff am Steuersystem des PPS, nämlich auf der Ebene der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, zustande kommt.
- 5.8. Exogenes Insulin führte dosisabhängig zur Abnahme des 6-Phosphogluconat/Glucose-6-Phosphat-Quotienten in der Pankreasinsel der Ratte, als Zeichen einer Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.
- 5.9. Diese Hemmung läßt sich mit der von anderen Autoren beobachteten Hemmung der Glucose-induzierbaren Insulinsekretion, der Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten und der Hemmung des PPS korrelieren.

- 5.10. Exogenes Insulin hemmt auch die durch p-Chlormercuribenzoat induzierte Sekretion von Insulin.
- 5.11. Hypothese : Es ist wahrscheinlich, daß exogenes Insulin über die Hemmung des PPS auf der Stufe der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zur Abnahme des NADPH/NADP-Quotienten, zur Verminderung von reduziertem Glutathion und auf diese Weise zur Abnahme solcher zell-oberflächlichen Thiol-Gruppen in der Membran der β -Zelle führt, die für die Sekretion von Insulin von Bedeutung sind.
- 5.12. Die Möglichkeit, daß die oben aufgeführten Wirkungen exogenen Insulins dem Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion zugrundeliegen könnten, wird diskutiert.

S U M M A R Y

1. These investigations were designed to explain a possible role of SH-groups, located in the β -cell membrane, in the release of insulin.
2. For this purpose we selected p-Chloromercuribenzoate (p-CMB), a thiol-reagent triggering insulin release supposedly by way of its action on superficial thiol-groups in β -cell membrane to study its insulin releasing effect on the rat isolated perfused pancreas. It was found to stimulate the release of insulin in a biphasic fashion.
3. Both phases of p-CMB-triggered insulin release were significantly suppressed by methylene blue (MB) which is known to oxidize NADPH in tissues.
4. The release of insulin initiated by p-CMB was also inhibited by diamide, an agent known to oxidize reduced glutathione (GSH) and also by t-butyl hydroperoxide (t-BHP) which oxidizes GSH in tissues by acting as a substrate of GSH-peroxidase.
5. Leucine, an amino acid which has been recently shown in our laboratories to raise NADPH levels in the pancreatic islets, increased the insulin releasing effect of p-CMB in an additive manner. Their combined effect was also inhibited by t-BHP.
6. These results suggest that stimulation of insulin release by p-CMB depends on islet NADPH and GSH contents. It is postulated that thiol-groups in β -cell membrane, supposedly related to the insulin release, are kept in the reduced state via the pentose phosphate shunt (PPS) $\longrightarrow$ NADPH $\longrightarrow$ GSH.

7. In the second part of this work, the possibility that exogenous insulin effects the regulatory step of the PPS, namely the conversion of glucose-6-phosphate (G-6-P) to 6-phosphogluconate (6-PG) by the enzyme G-6-P dehydrogenase, was studied by determining its effect on the 6-PG / G-6-P ratio in the rat pancreatic islets.
8. In response to rising concentrations of insulin in the incubation medium, the 6-PG/G-6-P ratio in the islets decreased, showing an inhibition of PPS at the G-6-P dehydrogenase step.
9. A close relationship was observed between the decrease of 6-PG/G-6-P ratio and the decrease of NADPH/NADP ratio, inhibition of the PPS as measured by $^{14}\text{CO}_2$ production and the decrease of the glucose-induced insulin release produced by the exogenous insulin.
10. Exogenous insulin also inhibited the p-CMB-triggered release of insulin in the rat isolated perfused pancreas .
11. It is, therefore, hypothesized that exogenous insulin inhibits PPS which leads to the decrease of NADPH/NADP ratio and to the decrease of GSH in the pancreatic islets. The GSH deficiency in turn leads to a decrease in the number of those thiol-groups in the β -cell membrane which are thought to be related to the insulin release initiated by p-CMB.
12. The possibility that the above mentioned action of the exogenous insulin plays a role in feedback inhibition of insulin release, is discussed in the light of available findings.

- 1) Christensen, H.N. and Cullen, A.M.:
Behaviour in the rat of a transport-specific bicyclic amino acid.
J.Biol.Chem., 244, 1521 - 1526 (1969)
- 2) Cerasi, E. and Luft, R.:
Diabetes mellitus - a disorder of cellular information transmission.
Horm.Metabol.Res., 2, 246 - 249 (1970)
- 3) Hellman, B., Sehlin, J. and Täljedal, I.-B.:
The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues.
II. Site of action of tolbutamide.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 45, 1384 - 1388 (1971)
- 4) Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.-B.:
Effects of phlorizin on metabolism and function of pancreatic β -cell.
Metab.Clin.Exp., 21, 60 - 66 (1972)
- 5) Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.-B.:
The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues.
V. Binding and stimulatory action of phlorizin.
Molec.Pharmacol., 8, 759 - 769 (1972)

- 6) Matschinsky, F.M., Landgraf, R., Ellerman, J. and Kotler-Brajtburg, J.:
Glucoreceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555 - 569 (1972)
- 7) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennet, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B. and Smith, D.F.:
Effects of Carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiol. 205 (4), 638 - 644 (1963)
- 8) Hellman, B.:
Methodological approaches to studies on the pancreatic islets.
Diabetologia 6, 110 - 120 (1970)
- 9) Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M. and Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, 538 - 545 (1972)
- 10) Ammon, H.P.T., Patel, T.N. and Steinke, J.:
The role of pentose phosphate shunt in glucose-induced insulin release: In vitro studies with 6-aminonicotinamide, Methylene blue, NAD^+ , NADH^+ , NADP^+ , NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic islets.
Biochim.Biophys,Acta 297, 352 - 367 (1973)

- 11) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B. and Smith, D.F.:
Effects of Carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am.J.Physiol. 205, 638 - 644 (1963)
- 12) Coore, H.G. and Randle, P.J.:
Regulation of insulin secretion, studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem.J. 93, 66 - 78 (1964)
- 13) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Simon, E. and Täljedal, I.B.:
The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues. I. Transport of mannoheptulose and the dynamics of insulin release.
Molec.Pharmacol. 8, 1 - 7 (1972)
- 14) Sehlin, J.:
Effects of mannoheptulose on the dynamics of glucose oxidation in the pancreatic β -cells.
FEBS Letters 30, 45 - 48 (1973)
- 15) Matschinsky, F.M. and Ellerman, J.:
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 50, 193 - 198 (1973)

- 16) Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J. and Matschinsky, F.M.:
Iodoacetate and Iodocataamide-induced alterations of pancreatic
- and β -cell responses.
Endocrinology 97, 698 - 708 (1975)
- 17) Ashcroft, S.J.H., Bassett, J.M and Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanism and glucose metabolism in
isolated islets.
Diabetes 21, Suppl. 2, 538 - 545 (1972)
- 18) Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C. and Randle, P.J.:
Interrelationship of islet metabolism, adenosine tri-
phosphate content and insulin release.
Biochem.J. 132, 223 - 231 (1973)
- 19) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and
Täljedal, I.B.:
The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues
Effects of calcium and sodium on glucose metabolism and
insulin release.
Biochem.J. 138, 33 - 45 (1974)
- 20) Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Bassett, J.M. and
Randle, P.J.:
The pentose phosphate cycle and insulin release in mouse
pancreatic islets.
Biochem.J. 126, 525 - 532 (1972)

- 21) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.B.:
The pancreatic β -cell recognition of insulin secretagogues.
VIII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers
and dihydroxyacetone.
Arch.Biochem.Biophys. 162, 448 - 457 (1974)
- 22) Krass, M.E. and Labella, F.S.:
Hexosemonophosphate shunt in endocrine tissues.
Biochim.Biophys.Acta 148, 384 (1967)
- 23) Field, J.B. and Lazarow, A.:
Comparison of the oxidation of C-1 and C-6 labelled glucose
by islet tissue.
Biol.Bull. 119, 313 (1960)
- 24) Field, J.B., Johnson, P., Herring, B. and Weinberg, A.N.:
Evidence for hexose-monophosphate pathway for glucose meta-
bolism in human pancreatic β -cells.
Natur (Lond.) 185, 468-469 (1960)
- 25) Keen, H., Sells, R. and Jarrett, R.J.C.:
Method for study of metabolism of isolated mammalian islet
and some preliminary results.
Diabetologia 1, 28 - 32 (1965)

- 26) Matschinsky, F.M., Kauffman, F.C. and Ellerman, J.E.:
Effects of hyperglycaemia on the hexose monophosphate
shunt in islets of Langerhans.
Diabetes 17, 475 - 480 (1968)
- 27) Kuzuya, T., Kanazawa, Y. and Kosaka, K.:
Plasma insulin response to intravenous administered
xylitol in dogs.
Metabolism 15, 1149 (1966)
- 28) Hirata, Y., Fujisawa, M., Sato, H., Asano, T. and
Katsuki, S.:
Blood glucose and plasma insulin responses to xylitol
administered intravenously in dogs.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 24, 471 (1966)
- 29) Montague, W. and Taylor, K.W.:
The role of the pentose phosphate pathway in insulin
secretion in The structure and metabolism of pancreatic
islets (Falkmer, S., Hellman, B. and Täljedal, L.B. eds.)
Pergamon Press, Oxford, pp 263 - 274 (1970)
- 30) Heinze, E. and Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: Difference
between fetal newborn and adult rats.
Endocrinology 88, 1259 - 1263 (1971)

- 31) Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In
vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143 - 148 (1972)
- 32) Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
Effect of 6-Aminonicotinamide on insulin release and C-14
glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Dif-
ference between glucose, tolbutamide nad aminophylline.
Endocrinology 91, 33 - 38 (1972)
- 33) Coper, H., Hadass, H. and Lison, H.:
Untersuchungen zum Mechanismus zentral nervöser Funktions-
störungen durch 6-Aminonicotinamid.
Naunyn Schmiedeberg's Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. 255,
97 - 106 (1966)
- 34) Ammon, H.P.T.:
Effect of tolbutamide on aminophylline, 3,5-AMP - dibutyrate -
or glucagon - induced insulin release from pancreatic islets
after impairment of pyridine nucleotide metabolism caused by
6-aminonicotinamide (6-AN).
Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. 290, 251 - 264 (1975)
- 35) Herken, H.:
Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminoni-
cotinamide on Membrane transport processes.
Arzneimittel-Forschung 18, 1235 - 1245 (1968)

- 36) Rall, I.W. and Lehninger, A.L.:
Glutathione reductase of animal tissues.
J.Biol.Chem. 194, 119 - 130 (1952)
- 37) Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A.,
Sehlin, J. and Täljedal, I.B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic β -cells.
Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem.J. 129, 241 - 254 (1972)
- 38) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and
Täljedal, I.B.:
Iodoacetamide-induced sensitisation of the pancreatic β -cells
to glucose stimulation.
Biochem.J. 132, 775 - 789 (1973)
- 39) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and
Täljedal, I.B.:
Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly
permeating disulphides.
Mol.Pharmacol. 9, 792 - 801 (1973)
- 40) Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Söderberg, M. and
Täljedal, I.-B.
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing
action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents,
and sulfonylureas.
Endocrinology 99, 1398 - 1406 (1976)

- 41) Frerichs, H., Reich, U. and Creutzfeld, W.:
Insulin secretion in vitro.
Klin.Wschr. 43, 136 - 141 (1965)
- 42) Iversen, J. and Miles, D.W.:
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin
secretion in the isolated perfused canine pancreas.
Diabetes 20, 1 - 9 (1971)
- 43) Rappaport, A.M., Ohira, S., Coddling, J.A., Empey, G.,
Kalnius, A., Lin, B.J. and Haist, R.E.:
Effects on insulin output and on pancreatic blood flow
of exogenous insulin infusion into an in situ isolated
portion of the pancreas.
Endocrinology 91, 168 - 176 (1972)
- 44) Assal, J.P., Patel, T.N. and Steinke, J.:
Tentative mechanism of insulin feedback inhibition of
insulin release.
Clin.Res. 21, 272 (Abstract) (1973)
- 45) Ammon, H.P.T.:
Effect of glucose and methylene blue (MB) on NADP, NADPH
and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch.Pharmacol. 272 Suppl. R 1 (Abstract) (1973)

- 46) Ammon, H.P.T. and Verspohl, E.:
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition
of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology (in press)
- 47) Gumaa, K.A., McLean, P. and Greenbaum, A.L.:
Compartmentation in relation to metabolic control in liver.
Essays Biochem. 7, 39 - 86 (1971)
- 48) Eggleston, L.V. and Krebs, H.A.:
Regulation of the pentose phosphate cycle.
Biochem.J. 138, 425 - 435 (1974)
- 49) Ammon, H.P.T. and Hoppe, E.:
Abstracts of the 11th Kongress der Deutschen Diabetes-
Gesellschaft, Braunlage, Abstract 1 (1976)
- 50) Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota,
U.S.A p 146 (1972)
- 51) Curry, D.L., Bennett, L.L. and Grodsky, G.M.:
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Endocrinology 83, 572 - 584 (1968)

- 52) Soeldner, J.S., Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin
using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771 - 779 (1965)
- 53) Lacy, P.E. and Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from
the rat pancreas.
Diabetes 16, 35 - 39 (1967)
- 54) Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Hasselberger, F.X. and
Schulz, D.W.:
Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the
glycolytic pathway in brain.
J.Biol.Chem. 239, 18 - 30 (1964)
- 55) Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Schulz, D.W. and Rock, M.K.:
The measurements of pyridine nucleotides by enzymatic cycling.
J.Biol.Chem. 236, 2746 - 2755 (1961)
- 56) Landgraf, R., Kotler-Brajtburg, J. and Matschinsky, F.M.:
Kinetics of insulin release from the perfused rat pancreas
caused by glucose, glucosamine and galactose.
Proc.Nat.Acad.Sci. 68, 536 - 540 (1971)

- 57) Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S. and Niklas, H.:
In vitro inhibition of glucose- and p-chlormercuri-
benzoate (CMB)-induced insulin release by methylene
blue (MB), diamide and t-butylhydroperoxide (t-BHP)-
Diabetologia 12, 376 (1976)
- 58) Ammon, H.P.T., Verspohl, E. and Wagner-Teschner, D.:
Possible significance of NADPH in glucose-induced
insulin release.
Manuscript in preparation
- 59) Ammon, H.P.T. and Wagner-Teschner, D.:
Effect of starvation on glucose-induced insulin release
, and NADPH/NADP ratio in rat pancreatic islets.
(to be published)
- 60) Rink, H.:
Thiol compounds in radiation biology. In Glutathione-
Proceedings of the 16th Conference of the German Society
of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch.,
Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme
Publishers, Stuttgart
p 206 - 216 (1974)

- 61) Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J.
and Täljedal, I.B.:
Membrane Sulphydryl Groups and the pancreatic β -cell
recognition of insulin secretagogues.
In Diabetes (Malaisse, W.J. and Pirart, J. eds),
pp 65 - 78, Excerpta Medica, Foundation, Amsterdam. (1974)
- 62) Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. and Correa, W.S.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation
of glutathione to the disulfide.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 37, 593 - 596 (1969)
- 63) Kosower, E.M., Correa, W. and Kinon, B.J.:
Glutathione VII. Differentiation among substrates by
the thiol oxidizing agent, diamide.
Biochim.Biophys.Acta 264, 39 - 44 (1972)
- 64) Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C. and Dentler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism
in erythrocytes - Organic hydro-Peroxides.
Biochem.J. 139, 289 - 295 (1974)
- 65) Sies, C., Gerstenecker, C., Menzel, H., and Flohé, L.:
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from
Hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic
oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171 - 175 (1972)

- 66) Matschinsky, F.M., Ellerman, J., Stillings, S.,
Rayband, F., Pace, C. and Zawalich, W.:
II. Hexoses and insulin secretion.
in Handbook of experimental Pharmacology Heffter-Heubner
New Series XXXII/2 (Born, G.V.R., Eichler, O., Farah, A.,
Herken, H. and Welch, A.D. eds.)
pp 79 - 114 (1975)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 67) Tomasi, V., Koretz, S., Ray, T.K., Dunnich, J. and
Marietti, G.V.:
Hormone action at the membrane level. II. The binding
of epinephrine and glucagon to the rat liver plasma
membrane.
Biochim.Biophys.Acta 211, 31 - 42 (1970)
- 68) Goldman, J.M. and Hadley, M.E.:
Sulfhydryl requirement for alpha adrenergic receptor
activity and melanophore stimulating hormone (MSH)
action on melanophores.
J.Pharmacol.Exp.Therap. 182 93 - 100 (1972)
- 69) Bartels-Bernal, E., Rosenberry, T.L. and Chang, H.W.:
A membrane activation cycle induced by sulfhydryl
reagents after affinity labeling of the acetylcholine
receptor of electroplax.
Mol.Pharmacol. 12, 813 - 819 (1976)

- 70) Cahill, G.F., Hasting, A.B., Ashmore, J. and Zottu, S.:
Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices.
X. Factors in the regulation of pathways of glucose
metabolism.
J.Biol.Chem. 230 , 125 - 135 (1958)
- 71) Montague, W. and Taylor, K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release.
Biochem.J. 115 , 257 - 262 (1969)
- 72) Ashcroft, S.J.H., Capito, K. and Hedekov, C.J.:
Time course studies of glucose-induced changes in
glucose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate content
of mouse and rat pancreatic islets.
Diabetologia 9, 299 - 302 (1973)
- 73) Matschinsky, F.M. and Ellerman, J.E.:
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J.Biol.Chem. 243, 2730 - 2736 (1968)
- 74) Ashcroft, S.J.H. and Randle, P.J.:
Enzymes of glucose metabolism in normal pancreatic islets.
Biochem.J. 119, 5 - 15 (1970)

Danksagungen

Herrn Prof.Dr.med.H.P.T.Ammon danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die zahlreichen Anregungen bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof.Dr.D.Hegner möchte ich für die Betreuung der Arbeit danken.

Weiterhin danke ich der Regierung der Bundesrepublik Deutschland sowie der Regierung von Pakistan dafür, daß sie mir die Gelegenheit zu diesen Studien in Westdeutschland durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes gegeben hat.

Ich danke weiterhin der University of Agriculture, Lyallpur, Pakistan, für die Freistellung von meinen Dienstaufgaben.

Lebenslauf

Am 19. September 1946 wurde ich, Muhammad Shoaib Akhtar, in Ludhiana (Indien) als Sohn des Lehrers Muhammad Ramzan-ul-Aziz und seiner Ehefrau Sharafat Sultana geboren.

Im Alter von 5 Jahren wurde ich eingeschult. Nach 10 Jahren absolvierte ich 1961 das Gymnasium (Matriculation). Von 1961 - 1963 besuchte ich in Lyallpur die Hochschule (Government Degree College). Hier studierte ich die Fächer Biologie, Chemie und Physik und bestand 1963 das Vorexamen in Medizin (Fellow of Science - Pre-medical). Von 1963 - 1967 studierte ich an der West Pakistan Agriculture University in Lyallpur Veterinärmedizin und legte dort 1967 die tierärztliche Hauptprüfung ab (Doctor of Veterinary Medicine, D.V.M.), die ich mit Auszeichnung bestand. Im August 1967 erhielt ich die Approbation zum Tierarzt. Im selben Jahr trat ich meine Stelle als "Instructor" in der Abteilung für Physiologie und Pharmakologie des Fachbereichs Tiermedizin an der West Pakistan Agriculture University in Lyallpur an.

Im Juni 1968 erhielt ich ein Stipendium der Universität in Lyallpur für das "Postgraduate" Studium der Pharmakologie und Therapeutics am Jinnah Postgraduate Medical Centre der Universität Karatschi.

Mit der Arbeit: "Study of Norepinephrine and 5-Hydroxytryptamine Contents of Hypothalami of Rats Treated with Harmidine Hydrochloride" erhielt ich den Grad des "Master of Philosophy". Die Abschlussprüfung legte ich im Mai 1971 ab.

Danach kehrte ich an die Abteilung für Physiologie und Pharmakologie der Fakultät Tiermedizin der West Pakistan Agriculture University in Lyallpur zurück. Im August 1973 wurde ich zum Dozenten in dieser Abteilung ernannt.

Im Oktober 1974 erhielt ich in der Bundesrepublik Deutschland vom Deutschen Akademischen Austauschdienst ein Stipendium zur weiteren Ausbildung im Fach Pharmakologie.

Seit April 1975 bis jetzt war ich mit der vorliegenden Dissertation bei Herrn Prof.Dr.med.H.P.T.Ammon beschäftigt. Mit Beginn des Sommersemesters 1976 habe ich mich an der Universität München im Fachbereich Tiermedizin immatrikuliert.

